A.T. Balaban I. Gălățeanu
G. Georgescu Ligia Simionescu

COMPUȘI MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI CU APLICAȚII ÎN MEDICINA NUCLEARĂ

Prof. dr. doc. ing. chim. A. T. BALABAN, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România, „fellow" al Academiei de Ştiinţe din New York, a condus timp de peste 10 ani, în perioada 1957—1971, Laboratorul de compuşi organici marcaţi din Institutul de fizică atomică Bucureşti, institut în care s-au produs primii compuşi radioactivi din ţară; şi în prezent, acest institut (Institutul de fizică şi inginerie nucleară) deţine rolul principal în acest domeniu. Actualmente predă chimia organică la Institutul politehnic Bucureşti. În perioada 1967—1971 a fost cercetător senior la Secţia de chimie a Agenţiei Internaţionale pentru Energia Atomică din Viena, unde a organizat conferinţe internaţionale privind radiochimia, compuşii marcaţi şi radiofarmaceutici şi a editat monografii în acest domeniu (*Radioisotope Production and Quality Control*, 1971; *Analytical Control of Radiopharmaceuticals*, 1970). În calitate de consultant al Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii a participat la elaborarea Farmacopeei Internaţionale. Este membru în comitetul de redacţie al mai multor periodice ştiinţifice: *Revue Roumaine de Chimie*, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, *Radiochemical and Radioanalytical Letters*, *Mathematical Chemistry* etc.

Dr. ing. chim. I. GĂLĂŢEANU a lucrat din 1956 ca cercetător ştiinţific şi a condus timp de mai mulţi ani (1972—1978) Secţia de producţie a radioizotopilor din Institutul de fizică atomică, avînd o experienţă de peste 20 de ani în producerea şi controlul radioizotopilor. În perioada 1964—1969 a fost cercetător principal în Divizia de cercetare şi laboratoare a Agenţiei Internaţionale pentru Energia Atomică din Viena, unde s-a preocupat de producerea şi controlul calităţii radiofarmaceuticelor. A publicat *Radiochimia aplicată*, în Editura Academiei, 1976.

Scanned with OKEN Scanner

Lucrarea de faţă a fost proiectată împreună cu dr. ing. Constanţa Măntescu, răpusă în plină activitate creatoare de o boală nemiloasă, a cărei cruzime a suportat-o cu un eroism incredibil. Constanţa Măntescu a fost unul dintre pionierii chimiei compuşilor organici marcaţi la noi în ţară — deschizînd astfel (prin competenţa şi realizările sale) noi drumuri cercetării ştiinţifice şi producţiei industriale.

Absolventă a Institutului politehnic din Bucureşti (1952), după o activitate fructuoasă în sectorul sintezei de medicamente, s-a specializat începînd din 1956 în fizica şi tehnica nucleară, înscriind, încă în primul deceniu al muncii de echipă, aplicaţii importante ale analizei cu neutroni în prospecţiunile geologice (lucrare premiată de Academia Republicii Socialiste România în 1966). Doctoratul, obţinut în 1968, îi consolidează preocupările în chimia nucleară. În cele peste cincizeci de lucrări ştiinţifice, Constanţa Măntescu a abordat chimia tritiului de recul, studiul reactivităţii atomilor liberi produşi din dezintegrări nucleare, utilizarea compuşilor marcaţi cu izotopi de viaţă scurtă în cercetarea biomecanismelor — în special în fiziologia şi fiziopatologia neuroendocrină, obţinerea atomilor „fierbinţi" de tritiu şi iod şi sinteza autohtonă a compuşilor radiofarmaceutici. Constanţa Măntescu a colaborat şi la elaborarea unui cunoscut şi util manual de chimia radiaţiilor *(1969).*

Personalitate dinamică, tenace şi perseverentă, în acelaşi timp optimistă şi tandră, devotată ştiinţei şi prieteniei, dr. ing. Constanţa Măntescu rămîne în amintirea celor care au cunoscut-o (şi îndeosebi a celor cu care a cola-

Scanned with OKEN Scanner

borat) o figură luminoasă de neuitat. Integrînd armonios inteligenţa lucidă, erudiţia savantului şi o feminitate inefabilă, Coca Mănţescu te ducea cu gîndul la Marie Curie, pe care dealtfel şi-o luase ca model exemplar de viaţă şi creaţie. Ştiinţa românească a numărat-o printre oamenii săi de nădejde, dar a avut durerea de a o pierde la o vîrstă care, pentru cei mai mulţi, însemnează abia începutul afirmării lor ştiinţifice.

Lucrarea de faţă vrea să fie un omagiu adus memoriei sale, îndeplinirea unei datorii morale faţă de o colegă respectată şi iubită dar prematur dispărută.

Scanned with OKEN Scanner

A. T. BALABAN, I. GĂLĂȚEANU, G. GEORGESCU,
LIGIA SIMIONESCU

COMPUȘI MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI CU APLICAȚII ÎN MEDICINA NUCLEARĂ

Scanned with OKEN Scanner

LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS APPLIED IN NUCLEAR MEDICINE

МЕЧЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, УПОТРЕБЛЯЕМЫЕ В ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЕ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
71021 Bucureşti, Calea Victoriei nr. 125, sectorul I

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Deși produsele radiofarmaceutice (PRF) sînt o descoperire relativ recentă, datînd doar de aproximativ un sfert de veac, ele au produs în diagnoza medicală o transformare la fel de importantă ca și aceea petrecută acum trei sferturi de secol, odată cu folosirea medicală a radiațiilor Röntgen. Actualmente, diagnosticul folosind radioizotopi de viață scurtă duce, de obicei, la iradieri ale pacienților inferioare celor produse de radiațiile Röntgen în examenele radiologice. Prin tropismul radiofarmaceuticelor față de anumite organe, leziuni sau procese, informațiile obținute cu ajutorul PRF sînt superioare celor date de alte metode, iar în multe cazuri sînt unice, nefiind accesibile detecției prin alte metode. Concentrațiile infime, la care se pot detecta și doza precis hormonii și alte componente ale serului sanguin prin metodele radioimunologice, deschid noi orizonturi investigațiilor clinice.

Prima parte a lucrării constituie o introducere în radioactivitate și în problemele obținerii radioizotopilor, compușilor marcați radioizotopic și produselor radiofarmaceutice. S-a urmărit prezentarea succintă a tuturor problemelor care se pun la prepararea PRF, de la principiile de bază și definițiile de bază, pînă la controlul calității produselor, insistînd asupra calităților care fac ca unii radioizotopi să fie preferați altora. Dacă în perioada primelor două decenii de aplicare a PRF se utilizau cu precădere radioizotopi β^--activi obținuți la reactoare nucleare, în ultimii ani se lărgește gama de aplicații a radioizotopilor β^+-activi preparați fie cu ajutorul generatorilor, fie la acceleratoare de particule. De asemenea, prin livrarea de truse alături de generatori, se diversifică modul de obținere a PRF: dacă radionuclizii cu timp de înjumătățire mediu sau lung pot fi înglobați în PRF într-un serviciu centralizat cum este Secția de producție radiochimică a Institutului de fizică și inginerie nucleară din București care livrează de mai mulți ani PRF întregii țări, pentru radionuclizii de viață scurtă prepararea lor și înglobarea în PRF trebuie făcută imediat înainte de folosire. Se pune deci problema cadrelor pregătite corespunzător pentru a efectua în cît mai bune condiții prepararea acestor PFR cu radioizotopi de viață scurtă — radiofarmaciști.

În partea a doua a lucrării, care tratează aplicațiile PRF în explorarea medicală in vivo, *s-a încercat edificarea și urmărirea consecventă a conceptului de „farmacologie diagnostică" prin similitudinea conceptuală cu ceea ce farmacologia clasică reprezintă pentru terapeut. Aplicațiile PRF în medicină au fost abordate* de pe pozițiile radiofarmacologiei diagnostice *în dorința de a acoperi, măcar în parte, hiatusul ce există în prezent între*

Scanned with OKEN Scanner

literatura ce tratează problemele de radiofarmacie şi literatura de medicină nucleară. Desigur că radiofarmacologia diagnostică, în calitate de disciplină preclinică fundamentală pentru medicina nucleară, are încă numeroase spaţii albe tributare deficienţelor de concept, organizare, metodologie etc. Aceste minusuri sînt reflectate implicit şi în lucrarea de faţă, adăugîndu-se lipsurilor inerente lucrărilor ce abordează domenii noi, interdisciplinare, cu dezvoltare rapidă. Tratînd de pe poziţiile radiofarmacologiei diagnostice problemele produselor radiofarmaceutice, autorii au avut permanent în vedere finalizarea aplicativă în medicina umană a acestei clase de compuşi; de aici, accentul pus pe problematica indicaţiilor, a aspectelor de farmacovigilenţă, ca şi încercarea de a sintetiza pe baza unor elemente semnificative criteriile de prescripţia diferenţiată a PRF.

Partea a treia a lucrării o constituie descrierea metodelor de radioimunodozări in vitro, *un domeniu a cărui importanţă a fost de curînd recunoscută prin decernarea Premiului Nobel dr. Rosalyn Yalow, descoperitoarea acestor metode. Deşi acest domeniu a apărut iniţial în cadrul endocrinologiei clinice, el s-a extins dincolo de aria medicinii umane, fiind aplicat cu succes în prezent şi în domenii ca medicina veterinară, zootehnia, biologia animală şi vegetală, chimia organică, radiochimie, antropologie şi demografie. Datorită dezvoltării vertiginoase din cadrul general al acestei metode extrem de sensibile, aspectele ei interdisciplinare se extind şi în sectoarele informaticii şi automatizării, chemate să contribuie la această dezvoltare.*

Lucrarea prezentă a fost scrisă de doi chimişti (unul cu formaţie de chimie organică, celălalt de chimie anorganică) şi de doi medici (unul cu formaţie de clinician, cealaltă de diagnostician de laborator). Lucrarea este *atît prin modul de concepţie şi redactare, cît şi prin natura ei,* interdisciplinară. *Autorii speră că ea va prezenta interes pentru chimişti şi radiochimişti, pentru biofizicieni şi radiobiologi, pentru farmacologi şi radiofarmacologi, şi în special pentru medicii de cele mai variate profile : dată fiind importanţa crescîndă a metodelor moderne de diagnostic, autorii speră că lucrarea va contribui la o mai bună cunoaştere şi răspîndire a PRF, cu avantajele şi limitările lor.*

Redactarea părţii I s-a făcut după cum urmează : capitolele 1, 3 şi secţiunile 4.7—4.10 au fost scrise de A.T. Balaban, iar capitolele 2, 5, 6 şi secţiunile 4.1—4.6 de I. Gălăţeanu.

Autorii mulţumesc şi pe această cale colegilor conf. dr. A. Constantinovici şi dr.Gh. Jovin care au contribuit prin capitolele 10 şi 7 din partea a II-a.

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Partea I. **RADIOIZOTOPI, COMPUȘI MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI**
(Prof. A.T. BALABAN și Dr. I. GĂLĂȚEANU)

Capitolul 1. **Izotopii, radioactivitatea și radiațiile nucleare** 17

1.1. *Izotopi radioactivi și stabili* 17
1.1.1. Constituția atomului 17
1.1.2. Constituția nucleului 18
1.1.3. Izotopi 18
1.1.4. Abundențele izotopilor stabili și nuclizilor primordiali 19
1.1.5. Radionuclizi 22
1.1.6. Stabilitatea nucleului 22
1.1.7. Energia reacțiilor nucleare 24

1.2. *Radioactivitatea* 26
1.2.1. Dezintegrarea beta 26
1.2.2. Legile dezintegrării radioactive 28
1.2.3. Echilibrul radioactiv 31
1.2.4. Caracteristicile nuclizilor 32
1.2.5. Radioactivitatea naturală 33
1.2.6. Scheme de dezintegrare 34
1.2.7. Radiația gamma și conversia internă 35
1.2.8. Stări metastabile, tranziții izomere 36
1.2.9. Dezintegrarea alfa 37
1.2.10. Reacții nucleare 37
1.2.11. Fisiunea și fuziunea nucleară 39

1.3. *Interacția radiațiilor nucleare cu materia* 41
1.3.1. Interacții cu particule grele încărcate electric 42
1.3.2. Interacții cu electroni și pozitroni 44
1.3.3. Interacții cu neutroni 46
1.3.4. Interacția radiațiilor electromagnetice 47

1.4. *Dozimetria radiațiilor* 53
1.4.1. Expunerea la radiații 53
1.4.2. Doza absorbită 54
1.4.3. Doza echivalentă 56
1.4.4. Constanta debitului de expunere la radiații 57
1.4.5. Doza absorbită intern 57
1.4.6. Protecția contra radiațiilor 59
Bibliografie 62

Capitolul 2. **Metode de producere a izotopilor folosiți în obținerea compușilor marcați și radiofarmaceutici** 65

2.1. *Secțiunea eficace a reacției nucleare* 65
2.2. *Radioizotopi obținuți în reactoarele nucleare* 66
2.2.1. Reacții nucleare (n, γ) 66
2.2.2. Reacții nucleare (n, p) și (n, α) 67
2.2.3. Reacții nucleare secundare 67
2.2.4. Reacția de fisiune a ^{235}U și a ^{239}Pu 68
2.3. *Radioizotopi obținuți în acceleratoarele de particule încărcate* . . 68

Scanned with OKEN Scanner

2.4. *Formarea și acumularea radioizotopilor în țintele iradiate cu neutroni, particule încărcate și fotoni* 70
2.5. *Radionuclizi obținuți din generatori de izotopi* 71
2.5.1. Generatorul de ^{99m}Tc 74
2.5.2. Generatorul de ^{113m}In 75
2.5.3. Tendințe și perspective 76
2.6. *Metode de separare și purificare a radioizotopilor* 77
2.6.1. Solubilizarea 78
2.6.2. Distilarea 78
2.6.3. Precipitarea și coprecipitarea 78
2.6.4. Separarea cromatografică 78
2.6.5. Extracția cu solvenți 79
Bibliografie 80

Capitolul 3. **Compuși marcați și radiofarmaceutici** 83

3.1. *Marcarea izotopică*. 83
3.1.1. Introducere 83
3.1.2. Izomeria izotopică; marcaj labil și stabil 84
3.1.3. Marcajul izotopic multiplu 84
3.1.4. Marcajul izotopic intrinsec și extrinsec 85
3.1.5. Marcaj specific, general și uniform 86
3.1.6. Caracterul statistic al marcajului izotopic 87
3.1.7. Puritatea chimică și stereochimică 87
3.1.8. Puritatea farmaceutică 88
3.1.9. Puritatea izotopică: radionuclidică și radiochimică 88
3.2. *Încorporarea izotopilor în compuși marcați* 89
3.2.1. Introducere 89
3.2.2. Clasificarea metodelor de încorporare a izotopilor în compuși marcați 90
3.2.3. Marcarea intrinsecă prin sinteză chimică 90
3.2.4. Marcarea intrinsecă prin schimb izotopic 93
3.2.5. Marcarea intrinsecă prin biosinteză 94
3.2.6. Marcarea intrinsecă prin sinteze radiochimice 95
3.2.7. Marcarea extrinsecă prin reacții chimice 96
3.2.8. Marcarea extrinsecă prin excitare 98
3.3. *Autoradioliza și conservarea compușilor marcați cu radioizotopi* 99
3.3.1. Introducere 99
3.3.2. Autoradioliza compușilor marcați cu radioizotopi 99
3.3.3. Conservarea compușilor marcați cu radioizotopi 101
3.3.4. Controlul periodic al purității compușilor marcați cu radioizotopi 102
3.4. Produse radiofarmaceutice 103
3.4.1. Definiția produselor radiofarmaceutice 103
3.4.2. Clasificarea produselor radiofarmaceutice 103
3.4.3. Probleme speciale ale produselor radiofarmaceutice 105
Bibliografie 107

Capitolul 4. **Obținerea compușilor marcați cu radioizotopi** 110

4.1. *Gaze rare* 110
4.2. *Compuși marcați cu* ^{123}I, ^{125}I *și* ^{131}I 112
4.2.1. Marcarea cu iod radioactiv prin schimb izotopic 113
4.2.2. Metoda de marcare prin substituție 116
4.2.3. Metoda marcării prin adiție la dubla legătură 117
4.2.4. Compuși radiofarmaceutici marcați cu iod radioactiv și tehnici de marcare 118
4.3. *Compuși organici marcați cu* ^{35}S *și* ^{75}Se 129
4.3.1. Compuși marcați cu ^{35}S 129

Scanned with OKEN Scanner

4.3.2. Compuşi marcaţi cu ^{75}Se 131
4.4. *Compuşi marcaţi cu* ^{32}P 131
4.4.1. Fosfatul de sodiu-^{32}P 132
4.4.2. Fosfatul cromic-^{32}P 132
4.4.3. Nucleotide marcate cu ^{32}P, ... 133
4.5. *Compuşi marcaţi cu* ^{99m}Tc 135
4.5.1. Pertechnetat de sodiu (^{99m}Tc). 135
4.5.2. Serumalbumină umană-^{99m}Tc 139
4.5.3. Complecşi-^{99m}Tc 139
4.5.4. Coloizi-^{99m}Tc 142
4.5.5. Antibiotice-^{99m}Tc 142
4.6. *Compuşi ce conţin* ^{113m}In *şi* ^{111}In 143
4.6.1. Complex ^{113m}In-DTPA 144
4.6.2. Coloizi de ^{113m}In 144
4.6.3. Macroagregate de serumalbumină-^{113m}In 145
4.6.4. Proteine plasmatice-^{113m}In 145
4.6.5. Antibiotice-^{111}In 146
4.7. *Compuşi marcaţi cu* ^{18}F 146
4.7.1. Marcarea prin sinteză chimică 147
4.7.2. Marcarea prin sinteză radiochimică 149
4.7.3. Radioizotopii clorului, bromului şi astatiniului 150
4.8. *Carbonul-14, radiocarbonul de viaţă lungă* 150
4.8.1. Obţinerea carbonului-14 151
4.9. *Carbonul-11, un radionuclid care renaşte* 154
4.9.1. Producerea carbonului-11 154
4.9.2. Compuşi marcaţi cu ^{11}C 156
4.10. *Tritiul, radioizotopul hidrogenului* 157
4.10.1. Obţinerea şi utilizările tritiului 157
4.10.2. Compuşi marcaţi cu tritiu: avantaje şi dezavantaje 160
4.10.3. Obţinerea compuşilor marcaţi cu tritiu 161
Bibliografie 165

Capitolul 5. **Trecerea de la compuşi marcaţi la compuşi radiofarmaceutici** 180
5.1. *Criterii de alegere a radionuclizilor pentru încorporarea lor în radiofarmaceutice* 181
5.2. *Caracteristicile şi producerea radiofarmaceuticelor* 182
Bibliografie 185

Capitolul 6. **Controlul de calitate al compuşilor marcaţi radiofarmaceutici** 186
6.1. *Conceptul controlului de calitate* 186
6.2. *Metode de determinare a purităţii radionuclidice şi radiochimice* 188
6.2.1. Metode de determinare a radioactivităţii 188
6.2.2. Metode de determinare a purităţii radionuclidice 188
6.2.3. Metode de determinare a purităţii radiochimice 189
6.2.4. Controlul biologic 194
Bibliografie 195

Partea a II-a, **PRODUSE RADIOFARMACEUTICE CU UTILIZARE DIAGNOSTICĂ ÎN MEDICINĂ** (Dr. Gheorghe Georgescu)

Capitolul 1. **Principii generale privind utilizarea diagnostică a produselor radiofarmaceutice** 199
1.1. *Elemente generale de radiofarmacocinetică* 199
1.1.1. Noţiuni şi terminologie în radiofarmacocinetică 200

Scanned with OKEN Scanner

1.1.2. Corelarea biocineticii radiofarmaceuticelor cu etapa de semnificație diagnostică 201
1.2. *Criteriile produsului radiofarmaceutic optim* 204
1.2.1. Criterii radionuclidice și de tehnologie diagnostică 204
1.2.2. Criterii radiofarmacocinetice 206
1.2.3. Criterii radiobiologice 206
1.2.4. Criterii economico-organizatorice 206
1.3. *Reacții adverse și efecte secundare după utilizarea diagnostică a produselor radiofarmaceutice* 207
1.3.1. Efecte secundare decurgînd din caracterul iradiativ al produselor radiofarmaceutice 207
1.3.2. Efecte secundare decurgînd din caracterul de produs farmaceutic 208
Bibliografie 209

Capitolul 2. **Radiofarmaceutice cu localizare selectivă tumorală** 211
2.1. *^{67}Galiu-citratul* 211
2.1.1. Elemente de farmacocinetică 211
2.1.2. Fixarea tumorală a radiogaliului 213
2.1.3. Mecanismul acumulării tumorale a ^{67}Ga-citratului 215
2.1.4. Acumularea radiogaliului la nivelul proceselor inflamatorii 216
2.1.5. Doze utilizate, iradiere, efecte secundare. 216
2.1.6. Indicațiile utilizării ^{67}Ga-citratului în scintigrafia clinică . . . 217
2.2. *Radiobleomicinele* 218
2.2.1. Structura 219
2.2.2. Elemente de farmacocinetică 219
2.2.3. Mecanismul localizării tumorale 221
2.2.4. Posologie — iradiere — efecte secundare 222
2.2.5. Probleme privind indicațiile de utilizare a radiobleomicinelor în diagnosticul oncologic 223
Bibliografie 224

Capitolul 3. **Radiofarmaceutice utilizate pentru explorarea glandei tiroide** *in vivo* 226
3.1. *Elemente de biocinetică a radiofarmaceuticelor utilizate pentru explorarea tiroidiană* 226
3.1.1. Biocinetica radioiodului 226
3.1.2. Biocinetica radiopertechnetatului 228
3.2. *Meritele relative ale principalelor produse radiofarmaceutice utilizate pentru diagnosticul tiroidian* in vivo; *Radioizotopii iodului* 229
3.2.1. Radionuclizi de uz clinic 229
3.2.2. Forme farmaceutice de administrare 232
3.2.3. Dozele de iradiere internă rezultînd din utilizarea diagnostică a radioizotopilor iodului 233
3.3. *Meritele relative ale principalelor produse radiofarmaceutice utilizate pentru diagnosticul tiroidian* in vivo; *^{99m}Tc-pertechnetatul* 234
3.4. *Criterii de prescripție a radiofarmaceuticelor utilizate pentru explorarea glandei tiroide* in vivo 235
Bibliografie 236

Capitolul 4. **Produse radiofarmaceutice utilizate în explorarea bronhopulmonară** 238
4.1. *Produse radiofarmaceutice particulate de perfuzie* 238
4.1.1. Principiul utilizării și condiții de validare diagnostică . . . 238
4.1.2. Produse utilizate — elemente de biocinetică 239

Scanned with OKEN Scanner

4.1.3. Iradiere 243
4.1.4. Toxicitate — efecte secundare 243
4.2. *Radiofarmaceutice de inhalare ca aerosoli* 246
4.3. *Gazele radioactive* 247
4.3.1. Gaze cu solubilitate sanguină ridicată 247
4.3.2. Gaze cu solubilitate sanguină redusă 248
4.4. *Indicațiile utilizării radiofarmaceuticelor în explorarea pneumologică* 252
Bibliografie 253

Capitolul 5. **Utilizarea radiofarmaceuticelor în explorarea cardio-vasculară** 255
5.1. *Radiofarmaceutice destinate investigării irigației miocardice* 255
5.1.1. Radiofarmaceutice cu tropism pozitiv pentru miocardul normal irigat 255
5.1.2. Radiofarmaceutice cu tropism pozitiv pentru miocardul ischemic 259
5.1.3. Indicații de utilizare a radiofarmaceuticelor destinate investigării irigației miocardice 261
5.2. *Radiofarmaceutice de obiectivizare a proceselor trombotice intravasculare* 262
5.2.1. Radiofarmaceutice de obiectivizare a trombilor în curs de formare 262
5.2.2. Radiofarmaceutice destinate detecției trombilor preformați. . 264
5.2.3. Indicații de utilizare a radiofarmaceuticelor destinate detecției proceselor trombotice 264
5.3. *Radiofarmaceutice destinate explorării hemodinamicii sistemice și loco-regionale* 265
5.3.1. Radiofarmaceutice pentru explorarea perfuziei tisulare . . . 265
5.3.2. Radiofarmaceutice pentru explorarea hemodinamicii la nivelul cavităților cardiace și a vaselor mari 267
Bibliografie 271

Capitolul 6. **Radiofarmaceutice utilizate în explorarea aparatului urinar** . . 274
6.1. *Radiofarmaceutice cu excreție predominant glomerulară* 274
6.1.1. Derivații radioiodați ai unor substanțe de contrast urografic 275
6.1.2. Vitamina B_{12} marcată cu radiocobalt 275
6.1.3. Radiochelați utilizați în investigarea filtrării glomerulare . . . 276
6.1.4. Aprecieri asupra utilizării radiofarmaceuticelor cu excreție glomerulară 278
6.2. *Radiofarmaceutice cu tropism predominant tubular* 278
6.2.1. Ortoiodohipuratul radioiodat 278
6.2.2. Radiofarmaceutice cu tropism predominant tubular utilizate în vizualizarea renală 281
6.3. *Indicații de utilizare a radiofarmaceuticelor în explorarea nefrourologică* 284
6.3.1. Indicații tehnico-metodologice 284
6.3.2. Indicații de utilizare în patologia aparatului urinar 284
Bibliografie 286

Capitolul 7. **Radiofarmaceutice folosite în investigarea aparatului digestiv.** (Dr. Gheorghe Jovin) 289
7.1. *Radiocoloizii folosiți în investigarea ficatului* 289
7.1.1. Aurul coloidal radioactiv (^{198}Au) 291
7.1.2. Coloizi marcați cu ^{99m}tehneţiu 293
7.1.3. Coloizi marcați cu ^{113m}indiu 294

7.2. *Radiofarmaceutice excretate prin bilă, folosite pentru scintigrafia hepatică şi a căilor biliare* 295
7.2.1. Radiolod-roz bengalul 296
7.2.2. Radiobromsulfaleina (BSP) 297
7.2.3. Compuşi hepato-biliari marcaţi cu ^{99m}Tc 297
7.3. *Radiofarmaceutice folosite în scintigrafia pancreasului* 297
7.4. *Radiofarmaceutice folosite în investigarea intestinului subţire* 298
7.4.1. Grăsimile marcate 298
7.4.2. Vitamina B_{12} marcată cu ^{57}Co sau ^{58}Co 299
7.4.3. Serumalbumina marcată cu ^{51}Cr 299
Bibliografie 300

Capitolul 8. **Produse radiofarmaceutice utilizate în explorarea hematologică** 301
8.1. *Produse radiofarmaceutice destinate explorării volumului plasmatic* 301
8.2. *Produse radiofarmaceutice pentru marcarea elementelor figurate sanguine* 302
8.2.1. Marcarea eritrocitelor cu ^{51}Cr 302
8.2.2. Marcarea eritrocitelor cu ^{99m}Tc 302
8.2.3. Marcarea eritrocitelor cu diizopropilfluorofosfat (DPF) 303
8.2.4. Marcarea altor elemente figurate sanguine 303
8.3. *Utilizarea produselor radiofarmaceutice în explorarea metabolismului fierului* 303
8.3.1. Elemente de ferocinetică 303
8.3.2. Produse radiofarmaceutice pentru determinări ale ferocineticii 305
8.4. *Produse radiofarmaceutice utilizate în vizualizarea splenică şi a măduvei osoase* 305
8.4.1. Produse radiofarmaceutice pentru vizualizarea splenică . . . 305
8.4.2. Produse radiofarmaceutice utilizate pentru vizualizarea măduvei osoase 306
8.5. *Iradierea provocată de produsele radiofarmaceutice utilizate în explorarea hematologică* 307
8.6. *Indicaţii de utilizare a produselor radiofarmaceutice în explorarea hematologică* 307
8.6.1. Aspecte tehnico-metodologice 308
8.6.2. Indicaţii de utilizare diagnostică 308
Bibliografie 309

Capitolul 9. **Radiofarmaceutice utilizate în scintigrafia osoasă** 311
9.1. *Calităţile radiofarmaceuticului ideal destinat scintigrafiei osoase* . 311
9.2. *Radioizotopii stronţiului* 312
9.3. *Fluorul* 314
9.4. *Radiofarmaceutice osteotrope marcate cu ^{99m}tehneţiu* (RFOT-^{99m}Tc) 315
9.4.1. Nomenclatura — structura 315
9.4.2. Farmacocinetica 316
9.4.3. Mecanismul fixării osoase a RFOT-^{99m}Tc 318
9.4.4. Fixarea extrascheletică a RFOT-^{99m}Tc 319
9.4.5. Toxicitate. Efecte secundare 320
9.5. *Criterii de prescripţie a radiofarmaceuticelor osteotrope* 321
9.6. *Indicaţiile actuale ale scintigrafiei osoase* 324
9.6.1. Tumori maligne 324
9.6.2. Afecţiuni osoase benigne 325
Bibliografie 325

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10. **Utilizarea radiofarmaceuticelor în investigarea sistemului nervos central.** (Conferenţiar Dr. ALEXANDRU CONSTANTINOVICI) . . 327
10.1. *Radiofarmaceuticele utilizate în studiile statice cerebrale* . . . 327
10.2. *Studiile dinamice ale circulaţiei sanguine cerebrale* 332
10.3. *Radiofarmaceutice utilizate în studiile dinamice ale circulaţiei lichidului cerebrospinal (Radiocisternografie)* 332
Bibliografie 334

Partea a III-a. **METODE DE ANALIZĂ *IN VITRO* FOLOSIND COMPUŞI MARCAŢI** (Dr. LIGIA SIMIONESCU)

Introducere 339

Capitolul 1. **Radioimunoanaliza (RIA)** 341

1.1. *Istoric* 341
1.2. *Principiul şi componentele sistemului de analiză* 342
1.3. *Terminologie,* 345
Bibliografie 345

Capitolul 2. **Reactivii principali ai sistemului RIA** 350

2.1. *Anticorpul — aspecte generale* 350
2.1.1. Definiţie 350
2.1.2. Caracteristici fizico-chimice 351
2.1.3. Subclasificări şi notaţii 352
2.1.4. Structura chimică a imunoglobulinelor 352
2.1.5. Locul (situsul) de combinare şi valenţa anticorpilor . . . 356
2.1.6. Alotipuri şi idiotipuri 357
2.1.7. Concluzii şi perspective 359
2.2. *Formarea anticorpilor* 359
2.2.1. Antigenul — aspecte generale 360
2.2.2. Antigenicitatea hormonilor şi a substanţelor hormonoide . . 361
2.2.3. Determinantele antigenice şi relaţia structură bio- şi imunoreactivă 364
2.3. *Serurile anti-hormoni* 367
2.3.1. Obţinerea antiserurilor — imunogenul 367
2.3.2. Imunopotenţarea — adjuvanţii 378
2.3.3. Căile de imunizare, doza, ritmul inoculărilor şi specia de animale 379
2.3.4. Reacţia antigen-anticorp *in vitro* 380
2.3.5. Caracterizarea şi utilizarea antiserului 385
2.4. *Hormonul marcat* 391
2.4.1. Hormonii proteici şi polipeptidici marcaţi cu radioiod . . . 391
2.4.2. Hormoni steroizi marcaţi cu radioiod 391
Bibliografie 391

Capitolul 3. **Alte componente ale sistemului RIA** 394

3.1. *Preparatul de referinţă sau standardul* 394
3.1.1. Cantificarea cu ajutorul preparatelor de referinţă 394
3.1.2. Necesitatea standardelor şi a standardizării 395
3.1.3. Selecţia şi elaborarea standardelor 397
3.1.4. Exprimarea rezultatelor 398
3.1.5. Utilizarea preparatelor de referinţă în laboratoarele de rutină 399
3.2. *Lichidele şi ţesuturile biologice* 400
3.3. *Mediul de incubare* 402
3.4. *Tehnici de separare a antigenului legat la anticorp de antigenul marcat liber* 405

Scanned with OKEN Scanner

3.4.1. Adsorbția antigenului liber pe fază solidă 408
3.4.2. Izolarea complexelor antigen-anticorp 411
3.4.3. Separarea în fază solidă prin fixarea anticorpului 413
3.4.4. Tehnici bazate pe migrarea diferențiată a antigenului liber și a complexelor antigen-anticorp 417

Bibliografie 419

Capitolul 4. **Standardizarea, optimizarea, validarea și controlul calității sistemelor de radioimunoanaliză și a celor similare** 422

4.1. *Aspecte generale* 422
4.2. *Standardizarea* 423
4.2.1. Reactivii — considerați individual 424
4.3. *Optimizarea și validarea sistemelor RIA și similare* 430
4.3.1. Validarea experimentală 431
4.3.2. Validarea statistică 431
4.3.3. Validarea calitativă (clinică) 433
4.3.4. Criterii de comparabilitate 435
4.3.5. Criterii de practicabilitate 437
4.3.6. Controlul global al calității 439
4.3.7. Considerații matematice 444
4.3.8. Automatizarea sistemelor de analiză cu radioliganzi 455

Bibliografie 461

Capitolul 5. **Metode de analiză înrudite cu metodele radioimunologice** . . 465

5.1. *Metode de analiză imunoradiometrice* 465
5.2. *Metode de radioanaliză prin legare competitivă cu proteine plasmatice* 466
5.3. *Metode radioreceptoare* 468
5.3.1. Considerații generale 468
5.3.2. Receptorii hormonilor polipeptidici și radioreceptor analiza . . 471
5.3.3. Concluzii și perspective 480
5.4. *Variante și metode de perspectivă* 482

Bibliografie 482

Încheiere: **Aplicații ale metodelor de analiză radiocompetitivă în medicina umană** 486

A. Aspecte generale 486
B. Categorii de substanțe măsurate prin metode RIA și similare 487
C. Măsurarea substanțelor biologic active în clinica umană . . 489
D. Exprimarea rezultatelor în sistemul de unități internaționale SI 491

Bibliografie 493

Labelled compounds and radiopharmaceuticals applied in nuclear medicine (Abstract) 495

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA I

RADIOIZOTOPI, COMPUŞI MARCAŢI ŞI RADIOFARMACEUTICI

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

IZOTOPII, RADIOACTIVITATEA ŞI RADIAŢIILE NUCLEARE

1.1. IZOTOPI RADIOACTIVI ŞI STABILI

1.1.1. CONSTITUŢIA ATOMULUI [1]

Sistemul periodic al elementelor, descoperit de Mendeleev în 1869, sistematizează elementele pe baza unui parametru pe care Mendeleev l-a intuit, fără să-i poată cunoaşte natura exactă. Acest parametru, care variază aproximativ paralel cu masele atomice, este determinat de structura atomului (care a devenit cunoscută abia în secolul XX), şi este reflectat în periodicitatea proprietăţilor chimice ale elementelor. Mendeleev a avut geniul de a pune această periodicitate la baza clasificării sale chiar atunci cînd masele atomice care-l călăuziseră iniţial ar fi dus (ca în cazul telurului şi iodului) la plasarea iodului înaintea telurului. Acest parametru al lui Mendeleev, numărul de ordine din sistemul periodic sau numărul atomic Z, nu este doar un index de catalogare ci are un sens fizic, aşa cum se va vedea mai departe.

La finele secolului trecut, experienţele au arătat că ipoteza discontinuităţii materiei este reală. Atomii prevăzuţi de Democrit acum 2000 de ani, cu mase măsurate în mod relativ de Dalton acum 150 de ani şi în mod absolut de Avogadro acum 120 de ani, ordonaţi într-un sistem de Mendeleev acum 100 de ani, au ei înşişi o structură. Ei sînt compuşi din particule încărcate electric, electronii, descoperiţi de J.J. Thomson, purtînd cîte o sarcină elementară negativă, cu masa de $10^3 - 10^5$ ori mai mică decît a nucleului încărcat pozitiv, în jurul căruia ei se învîrtesc cu viteze enorme.

Experienţele lui Rutherford (1911) au arătat că nucleul fiecărui element poartă atîtea sarcini elementare pozitive cît este numărul său de ordine Z. Modelul atomic al lui Bohr (1913), fundamentat mai tîrziu prin mecanica cuantică, consideră atomul neutru ca fiind format dintr-un nucleu cu Z sarcini pozitive care concentrează practic toată masa atomului şi dintr-un număr de Z electroni gravitînd în jurul nucleului. Caracterul dual corpuscular-ondulatoriu al acestor electroni face stabile numai anumite stări energetice ale acestor electroni, adică numai anumite orbite, determinate de numerele cuantice. Principiul de excluziune formulat de Pauli (1925) explică cu ajutorul numerelor cuantice de ce, pe măsură ce trecem de la atomii mai uşori la alţii mai grei, electronii se grupează pe orbite din ce în ce mai îndepărtate de nucleu, ducînd la proprietăţi chimice şi fizice asemănătoare cînd pe pătura cea mai îndepărtată (pătura de valenţă) există acelaşi număr de electroni : sistemul periodic al elementelor decurge astfel pe o bază logică, iar fenomenele chimice determinate de electronii din pătura de valenţă pot fi înţelese uşor. Cu consum sau degajare relativ mică de energie, electronii de valenţă pot fi îndepărtaţi sau adăugaţi

Scanned with OKEN Scanner

atomilor ducînd la ioni pozitivi, respectiv negativi, care dau combinaţii chimice electrovalente, sau pot duce la formarea de noi legături chimice, covalente ori metalice.

1.1.2. CONSTITUŢIA NUCLEULUI [2—29]

Revenind la nuclee, descoperirea izotopilor (denumire propusă de Soddy în 1912) a arătat că şi nucleul la rîndul său este compus din două feluri de particule elementare de masă aproximativ egală : Z protoni (adică nuclee de hidrogen, încărcate cu cîte o sarcină elementară pozitivă) şi N neutroni (descoperiţi abia în 1932) suma $Z + N = A$ fiind aproximativ egală cu masa atomului respectiv.

Prin urmare sensul fizic al numărului atomic Z (numărul de ordine din sistemul lui Mendeleev) este : numărul de protoni, deci de sarcini electrice pozitive, ale nucleului (egal şi cu numărul total de electroni ai atomului neutru).

Într-o scală atomică relativă raportată la unitatea atomică de masă u.a.m. (definită ca fiind exact a 12-a parte din masa unui atom de carbon-12) aproximativ egală cu masa atomului de hidrogen, masele atomice ale izotopilor sînt numere foarte apropiate de numerele naturale. Numărul de atomi dintr-un gram de hidrogen (adică dintr-un atom-gram) fiind $\mathcal{N} = 6 \cdot 10^{23}$ atomi/atom-gram, adică numărul lui Avogadro *, masa absolută a unui atom de hidrogen, a unui proton sau a unui neutron este de aproximativ $1/\mathcal{N}$ grame, iar masa de repaus aproximativă a unui electron este $1/(1840\ \mathcal{N})$ grame. Mai exact, 1 u.a.m. $= 1{,}66053 \cdot 10^{-24}$ g, iar masa electronului este 0,00055 u.a.m. $= 9{,}10956 \cdot 10^{-28}$ g [30, 31].

Energiile care leagă protonii şi neutronii într-un nucleu sînt mult mai mari (de $10^3 - 10^6$ ori decît energiile chimice), de aceea fenomenele nucleare nu sînt afectate de temperatură, presiune, catalizatori etc. care sînt folosiţi în chimie, fiindcă aceşti agenţi pun în joc energii prea mici. Nucleul rămîne neschimbat în reacţiile chimice, care modifică doar învelişul electronic exterior al atomilor ; de aceea nucleul este „buletinul de identitate" sau „paşaportul" atomului, dar din semnalmentele de pe acest „paşaport", doar sarcina electrică a celor Z protoni este importantă pentru chimie, numărul N de neutroni (deci şi masa atomică A) nemodificînd comportarea chimică a atomului.

1.1.3. IZOTOPI

Sistemul periodic al elementelor capătă, prin existenţa izotopilor, o a treia dimensiune : fiecare căsuţă a tabloului lui Mendeleev adăposteşte mai mulţi izotopi ** sau nuclizi, pe care ni-i putem închipui etajaţi în ordinea creşterii lui N.

Deşi constituie o inechitate faţă de celelalte elemente, există o justificare pentru faptul că izotopii unui element şi numai ai acestuia,

---

* Acesta este numărul de atomi dintr-un atom-gram al oricărui element, ori de molecule pe mol din orice compus chimic.

** Însăşi etimologia cuvîntului izotop (isos = acelaşi, topos = loc) exprimă faptul că izotopii aceluiaşi element ocupă aceeaşi căsuţă a sistemului periodic.

Scanned with OKEN Scanner

hidrogenul, au primit fiecare cîte un nume, spre deosebire de izotopii tuturor celorlalte elemente (protiul ^1H, deuteriul ^2H sau D, tritiul ^3H sau T): hidrogenul este primul element, cel mai răspîndit din univers, şi adesea folosit ca particulă bombardantă în acceleratoare. Există o analogie cu substanţele chimice care, în general, pot exista în trei stări de agregare, totuşi una singură are cîte un nume diferit în fiecare din aceste stări: apa, gheaţa şi aburul.

Un nuclid *, M, este caracterizat prin anumite valori pentru Z şi N, sau Z şi A, unde $A = Z + N$, ceea ce se notează prin ${}^A_Z\mathrm{M}$ ori ${}^A\mathrm{M}$. Trebuie accentuat că denumirea *elementului* este în corespondenţă biunivocă cu numărul său atomic Z, cu alte cuvinte Z determină numele elementului şi vice-versa; pentru a specifica un anumit *izotop* (radioactiv ori stabil) al unui element, mai trebuie cunoscută încă o dată suplimentară, pe lîngă Z (aceasta poate fi, indiferent, A ori N). De aceea, un nuclid este perfect determinat prin A şi Z sau prin simbolul elementului M ori denumirea lui şi masa atomică A.

Numărul de neutroni N (deci şi masa nuclidului $A = Z + N$) poate varia între anumite limite pentru un Z dat, ducînd la izotopii elementului respectiv. Izotopii aceluiaşi element sînt definiţi ca atomi avînd acelaşi număr Z de protoni, dar numere diferite de neutroni N_1, N_2,..., ducînd deci la mase atomice diferite $A_1 = Z + N_1$, $A_2 = Z + N_2$,...

1.1.4. ABUNDENŢELE IZOTOPILOR STABILI ŞI NUCLIZILOR PRIMORDIALI

După ce, în 1919, Aston a inventat spectrograful de mase, au fost cercetate cu el toate elementele naturale, găsindu-se că majoritatea lor sînt compuse din mai mulţi izotopi. Compoziţia izotopică a elementelor este în prezent constantă indiferent de sursa din care provine elementul, din scoarţa pămîntească, de pe lună, ori din meteoriţi (aşa cum se va vedea mai jos, ea variază în durate îndelungate de timp, de ordinul miliardelor de ani).

Se ştie că galaxiile observabile au o vîrstă de aproximativ 20 miliarde de ani ($2 \cdot 10^{10}$ ani), rezultînd în urma unei explozii nucleare cunoscute în cosmogonie sub numele de „big bang" [32] care, împreună cu procesele nucleare ulterioare, au dus la generarea tuturor nuclizilor posibili în proporţii determinate de energiile de legătură din nuclee.

Abundenţele izotopice ale nuclizilor pe pămînt sînt determinate de trei factori: de abundenţele izotopice cosmice, de stabilitatea nuclizilor şi de potenţialul gravitaţional al planetei noastre. În cosmos, nuclizii cei mai răspîndiţi sînt ^1H, ^4He (de 10 ori mai puţin ca ^1H), ^{16}O (de 1500 de ori mai puţin ca ^1H), ^{14}N (de 2000 de ori), ^{12}C (de 3000 de ori) etc. Pămîntul nu a putut reţine în atmosferă heliul, iar majoritatea hidrogenului s-a pierdut, de asemenea, sub formă de H_2, căci viteza medie a acestor molecule uşoare la temperaturile din atmosferă este superioară vitezei cosmice de scăpare din potenţialul de atracţie pămîntesc. Moleculele mai grele, ca H_2O, O_2, N_2 etc., sînt reţinute de gravitaţia terestră. Dintre nuclizii nesta-

* Deşi noţiunile nuclid şi izotop sînt sinonime, ele nu se pot folosi una în locul celeilalte, aşa cum în zicala „şi-a dat arama pe faţă" nu se poate înlocui „arama" cu sinonimul ei, „cuprul". Noţiunea de izotop implică un termen de comparaţie, izotop al... ori cu... în timp ce noţiunea de nuclid este de sine stătătoare.

bili (adică radioactivi, a se vedea mai departe) există azi pe (sau în) pămînt doar așa-numiții *nuclizi primordiali* cu timp de înjumătățire de cel puțin 10^8 ani (care mai există încă, în cantități ce scad exponențial în timp, de la „big bang"-ul inițial). Este de remarcat că cei 20 de nuclizi primordiali, prezentați în tabela 1.1, au timpi de înjumătățire cuprinși între $7 \cdot 10^8$ ani

TABELA 1.1
Radionuclizi primordiali

Z	A	Denumire	Simbol	$T_{1/2}$ ani	Abundența %	Radiații
19	40	Potasiu	^{40}K	$1{,}28 \cdot 10^9$	0,012	β^-, CE, β^+, γ
37	87	Rubidiu	^{87}Rb	$4{,}7 \cdot 10^{10}$	27,83	β^-
48	113	Cadmiu	^{113}Cd	$9 \cdot 10^{15}$	12,3	β^-
49	115	Indiu	^{115}In	$6 \cdot 10^{14}$	95,7	β^-
52	123	Telur	^{123}Te	$1{,}24 \cdot 10^{13}$	0,87	CE, γ
57	138	Lantan	^{138}La	$1{,}3 \cdot 10^{11}$	0,09	β^-, CE, γ
60	144	Neodim	^{144}Nd	$2{,}1 \cdot 10^{15}$	23,9	α
62	147	Samariu	^{147}Sm	$1{,}06 \cdot 10^{11}$	15,0	α
62	148	"	^{148}Sm	$7 \cdot 10^{15}$	11,2	α
64	152	Gadoliniu	^{152}Gd	$1 \cdot 10^{14}$	0,20	α
71	176	Lutețiu	^{176}Lu	$3{,}3 \cdot 10^{10}$	2,6	β^-, γ
72	174	Hafniu	^{174}Hf	$2{,}0 \cdot 10^{15}$	0,18	α
75	187	Reniu	^{187}Re	$5 \cdot 10^{10}$	62,60	β^-
76	186	Osmiu	^{186}Os	$2{,}0 \cdot 10^{15}$	1,6	α
78	190	Platină	^{190}Pt	$6{,}1 \cdot 10^{11}$	0,013	α
82	204	Plumb	^{204}Pb	$1{,}4 \cdot 10^{17}$	1,4	α, γ
90	232	Toriu	^{232}Th	$1{,}405 \cdot 10^{10}$	100	α, γ, fs
92	235	Uraniu	^{235}U	$7{,}04 \cdot 10^8$	0,720	α, γ
92	238	"	^{238}U	$4{,}47 \cdot 10^9$	99,28	α, γ, fs

(al ^{235}U, baza energeticii nucleare) și 10^{17} ani; este de așteptat ca, pe măsură ce tehnicile de măsură progresează, tabela acestor radionuclizi primordiali să crească cu nuclizii considerați azi ca fiind *stabili*, fiindcă au timpi de înjumătățire prea lungi pentru a fi determinați cu metodele actuale.

Nuclizii, sau izotopii, stabili se definesc ca fiind cei la care nu se observă fenomene de dezintegrare radioactivă. Evident, o asemenea definiție negativă este nesatisfăcătoare. Cînd, în viitor, se vor putea măsura experimental, sau determina mai exact prin calcul, timpi de înjumătățire mai lungi de 10^{17} ani, va trebui să se adopte convențional o definiție a „nuclizilor stabili", de ex. cei cu timp de înjumătățire peste 10^8 ani (deci înglobînd printre nuclizii „stabili" și pe cei primordiali), or, dimpotrivă, excluzîndu-i și luînd o limită inferioară a timpului de înjumătățire de circa 10^{18} ani. Oricum, numărul nuclizilor stabili cunoscuți va rămîne staționar sau, mai probabil, va scădea.

Deși, în teorie, nu există nuclizi complet stabili, unele nuclee foarte stabile, de ex. ^4He și ^{16}O, trebuie să aibă timpi de înjumătățire extraordinar de lungi (a se vedea mai departe).

Sînt monoizotopice următoarele 20 de elemente: $^{9}_{4}Be$, $^{19}_{9}F$, $^{23}_{11}Na$, $^{27}_{13}Al$, $^{31}_{15}P$, $^{45}_{21}Sc$, $^{55}_{25}Mn$, $^{59}_{27}Co$, $^{75}_{33}As$, $^{89}_{39}Y$, $^{93}_{41}Nb$, $^{103}_{45}Rh$, $^{127}_{53}I$, $^{133}_{55}Cs$, $^{141}_{59}Pr$, $^{159}_{65}Tb$, $^{165}_{67}Ho$, $^{169}_{69}Tm$, $^{197}_{79}Au$, $^{209}_{83}Bi$. Se observă că (cu excepția beriliului unde lipsește $^{8}_{4}Be$ care se descompune în două particule α), toți acești nuclizi au număr impar de protoni și număr par de neutroni. Acest fapt reflectă o lege a stabilității nucleului care iese în evidență dacă se

Scanned with OKEN Scanner

face un recensămînt al tuturor celor 281 *nuclizi stabili* după paritățile numerelor de protoni și neutroni (tab. 1.2.).

Se vede că nuclizii par-pari sînt cei mai numeroși (58,8%) deci cei mai stabili; nuclizii par-impari (20,3 %) și cei impar-pari (18,9%) sînt mai puțin stabili; nuclizii impar-impari (doar 2,1% din numărul

TABELA 1.2

Repartizarea celor 281 nuclizi stabili (1977) după paritatea lui Z și N

Număr de protoni, Z	Număr de neutroni, N	Număr de nuclizi stabili	Observații
Par	par	165	—
Par	impar	57	includ elementele monoizotopice
Impar	par	53	—
Impar	impar	8	$^{2}_{1}H$, $^{6}_{3}Li$, $^{10}_{5}B$, $^{14}_{7}N$, $^{50}_{23}V$, $^{180}_{73}Ta$

total al nuclizior stabili) sînt cei mai puțin stabili, în special pentru $Z > 7$ *. Aceste observații își găsesc confirmarea în teoria păturilor nucleare (Maria Goeppert-Mayer și J.H. D. Jensen, 1948). Așa cum în atom există pături electronice stabile, determinate de principiul lui Pauli, cu 2, 8, 18 ori 50 de electroni, tot așa în nucleu numerele de 2, 8, 20, 28, 50, 82, 126 protoni ori neutroni determină o mare stabilitate. Nu este întîmplător faptul că nuclizii $^{4}_{2}He$ și $^{16}_{8}O$ au abundențe cosmice mari, ci acest lucru se datorește faptului că acești doi nuclizi (ca și $^{40}_{20}Ca$ și $^{208}_{82}Pb$) au „numere magice" atît de protoni cît și de neutroni fiind de aceea excepțional de stabili (nucleele de heliu, sau particulele α, chiar se desprind din toți nuclizii cu $Z > 83$, care nu mai pot avea din acest motiv izotopi stabili). Mai există încă două elemente fără izotopi stabili, dar cu $Z < 83$, și anume $_{43}Tc$ și $_{61}Pm$, la care toți nuclizii cunoscuți sînt radioactivi.

În concluzie, un element chimic este ansamblul izotopilor stabili ai acestui element, iar masele atomice chimice rezultă din masele nuclizilor stabili și din proporția acestora; astfel, masa atomică 35,453 a clorului rezultă din cei doi izotopi stabili ai clorului: ^{35}Cl (75,77 %) și ^{37}Cl (24,23 %); masa atomică 79,904 a bromului rezultă din cei doi nuclizi stabili: ^{79}Br (50,60 %) și ^{81}Br (49,31 %), iar masa 127,60 a telurului din media ponderată a celor 7 nuclizi stabili ai telurului și a nuclidului său primordial. În acest ultim caz, iodul, element monoizotopic ^{127}I, rezultă cu o masă atomică mai mică decît a elementului anterior, telurul, din cauza acestei ponderări în care predomină proporția nuclizilor stabili mai grei ai telurului. Se mai întîlnesc și alte inversii ale maselor atomice în sistemul periodic, de ex. argonul are masa atomică 39,948 mai mare decît a potasiului (masa atomică 39,102) care-l urmează în sistemul periodic. Explicația acestei anomalii constă în aceea că ^{40}K este un nuclid primordial care s-a dezintegrat în mare parte trecînd în ^{40}Ar; aceasta este explicația cantității anormal de mari de argon din atmosferă față de celelalte gaze rare, precum și a faptului că din cei trei izotopi stabili ai argonului, ^{36}Ar, ^{38}Ar și ^{40}Ar, ultimul este conținut în proporție de 99,59 %. Prin această dezintegrare, masa atomică medie a potasiului, în care acum predomină ^{39}K, a scăzut,

* Singurii nuclizi impar-impari „stabili" cu $Z > 7$, ^{50}V și ^{180}Ta, sînt probabil radioactivi dar cu viață prea lungă pentru a fi determinată cu tehnica actuală.

iar cea a argonului a crescut în decursul celor aproximativ 10 miliarde de ani de cînd datează sistemul solar, producînd inversia actuală a maselor atomice medii. O metodă de datare a rocilor foarte vechi se bazează tocmai pe cercetarea raportului $^{40}Ar—^{40}K$ [33, 34]. S-a calculat că energia dezintegrării ^{40}K a avut un aport substanţial la căldura geotermică (datorată în părţi egale colapsului gravitaţional şi proceselor radioactive: circa 20% din ultimele reprezintă contribuţia procesului $^{40}K \rightarrow {}^{40}Ar + \beta^-$).

Încă nu s-a încetăţenit o denumire simplă pentru nuclizii stabili care să poată duce, prin derivare, la un adjectiv; în prezenta lucrare vom folosi ocazional pentru nuclizii stabili termenul de stabilonuclizi şi adjectivul stabilonuclidic.

1.1.5. RADIONUCLIZI

Nuclizii care nu sînt stabili se numesc nuclizi radioactivi sau radionuclizi; numărul radionuclizilor cunoscuţi este mult mai mare decît al nuclizilor stabili, şi este în continuă creştere, pe măsură ce se prepară noi radionuclizi (sau se descoperă că nuclizi crezuţi pînă acum stabili au în realitate timpi de înjumătăţire foarte lungi). Pînă în prezent se cunosc peste 1000 de radionuclizi bine caracterizaţi, şi cîteva zeci îndoielnici sau insuficient caracterizaţi.

La elementele cu $Z < 60$, există două tipuri principale de radionuclizi, şi anume β^+-activi şi β^--activi. La elementele cu $Z > 60$ apar în plus nuclizi α-activi, iar la elementele cu $Z > 90$ apar în plus nuclizi care suferă fisiune spontană. Să examinăm mai îndeaproape cauzele care determină radioactivitatea şi aceste felurite tipuri de radioactivitate.

1.1.6. STABILITATEA NUCLEULUI

Reprezentînd într-o diagramă (fig. 1.1) [31, 35, 36] toţi nuclizii cunoscuţi, cu N pe axa absciselor şi cu Z pe axa ordonatelor, izotopii aceluiaşi element sînt înşiruiţi în căsuţele de pe aceeaşi orizontală.

Nuclizii stabili se înşiruie în apropierea bisectoarei principale a diagramei ($N/Z = 1$) pînă la $Z = 20$, dar la $Z > 20$ ei încep să conţină mai mulţi neutroni decît protoni. Această regiune a nuclizilor stabili se numeşte zona de stabilitate nucleară.

Nuclizii cu aceleaşi valori pentru numărul de masă A se numesc izobari. Ei se plasează pe drepte perpendiculare pe bisectoarea discutată în paragraful anterior.

În teoria nucleului, protonul şi nucleonul sînt consideraţi ca fiind două manifestări diferite ale aceleiaşi particule, numită nucleon. Natura forţelor nucleare care reţin nucleonii în interesul nucleului (diametru circa 10^{-13} cm, în timp ce atomii au diametre de circa 10^{-8} cm), în ciuda respingerii electrostatice dintre protoni şi a densităţii uriaşe a nucleului, de 10^8 tone/cm^3, a putut fi elucidată abia în ultima vreme. Este clar că neutronii acţionează ca un fel de ciment şi că există un raport optim între numărul neutronilor şi al protonilor pentru a asigura stabilitatea nucleului: la elementele uşoare cu $Z < 20$, acest raport este aprox. 1, dar la elementele grele raportul creşte atingînd la cel mai greu nuclid stabil cunoscut, $^{209}_{83}Bi$, valoarea de $N/Z = (209-83)/83 = 1{,}5$.

Scanned with OKEN Scanner

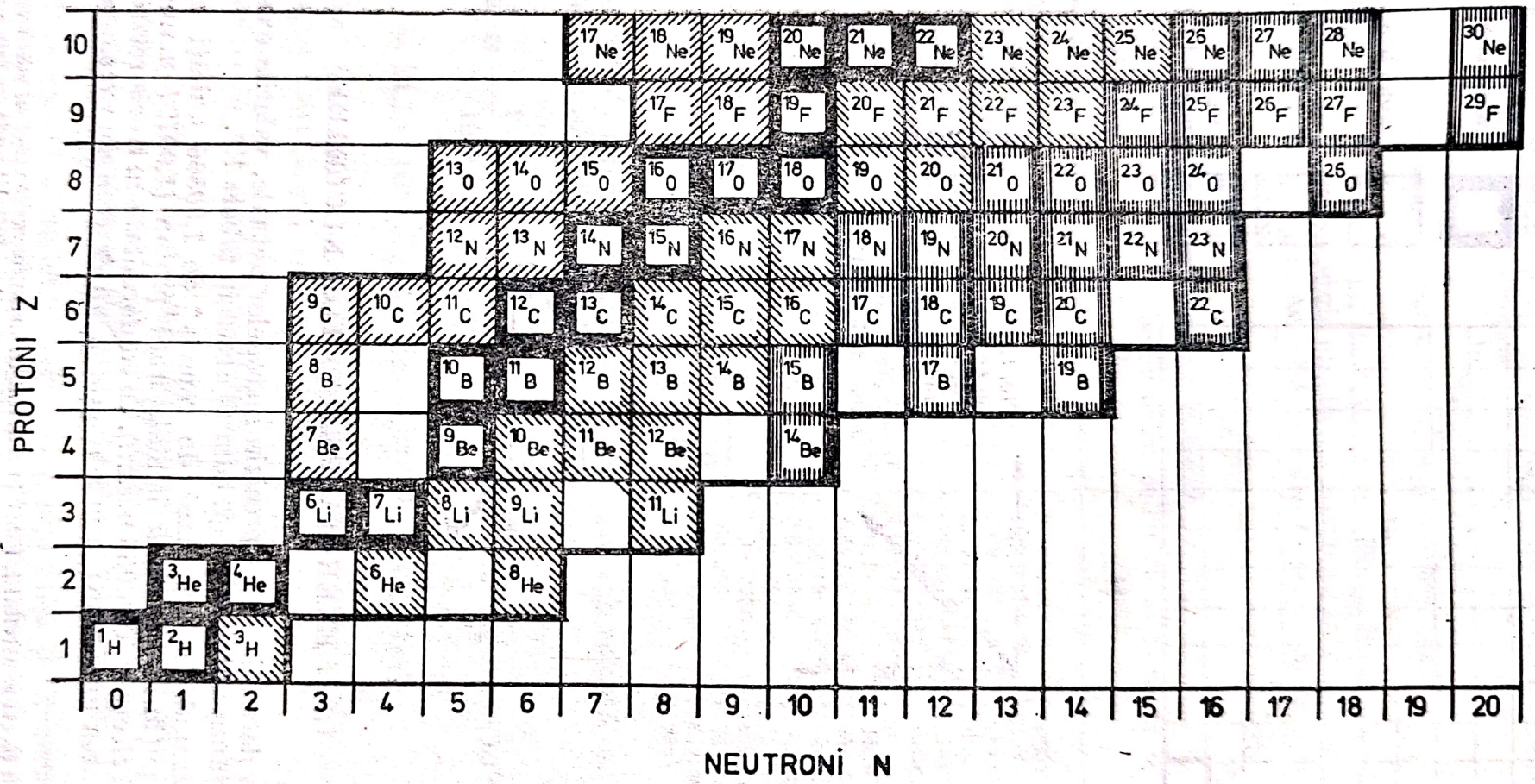
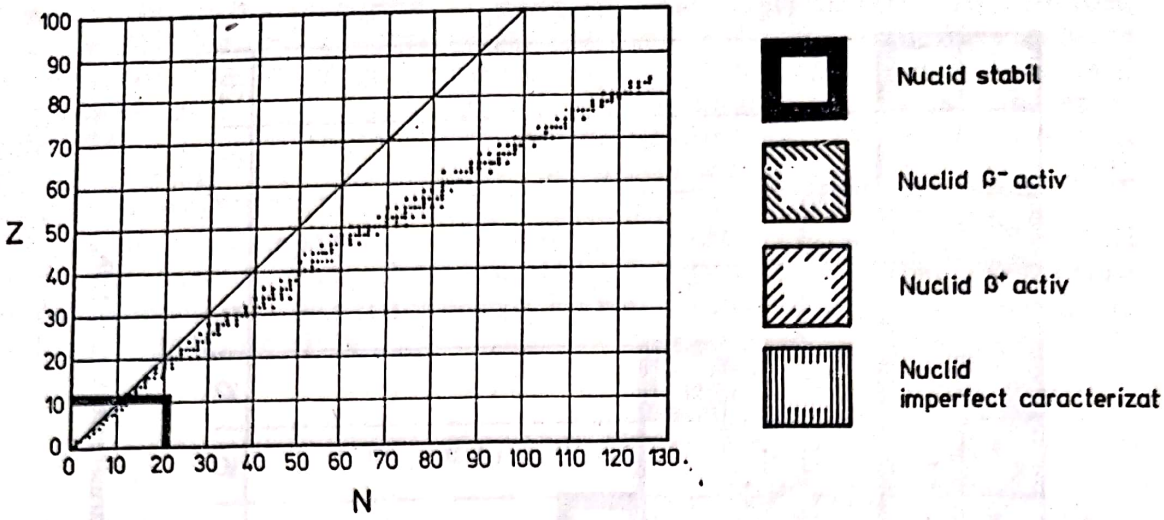


Fig. 1.1a — Începutul tabelei nuclizilor (diagrama Z — N). Explicații pe pagina următoare la fig. 1.1b.

Scanned with OKEN Scanner



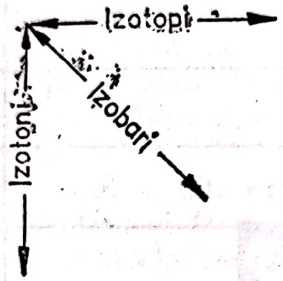
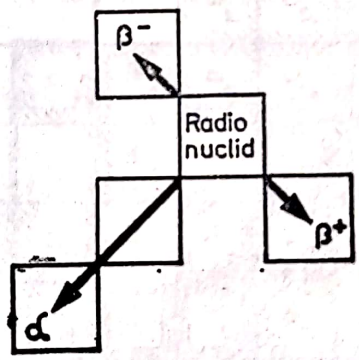


Fig. 1.1b. — Aspectul „zonei de stabilitate nucleară" în diagrama completă Z—N: punctele reprezintă nuclizii stabili care în fig. 1.1a (reprezentată aici de domeniul încadrat) erau figurați în căsuțe negre.



1.1.7. ENERGIA REACȚIILOR NUCLEARE

S-au determinat, cu precizia metodelor actuale, valorile exacte ale unor constante universale, așa cum se arată în tabela 1.3.

Neutronul, ${}_0^1n$, are masă de repaus* de 1,00866 unități atomice de masă, puțin mai mare decît masa unui proton (1,00727 u.a.m.) plus masa unui electron (0,00055 u.a.m.). În conformitate cu teoria relativității, transformarea unui neutron într-un proton, un electron și un antineutrino $\tilde{\nu}$

---

* Prin teoria relativității, Einstein a arătat că masa corpurilor care se mișcă cu viteze v apropiate de viteza luminii, c, crește după expresia $m = m_0(1-v^2/c^2)^{-1/2}$, unde m_0 este o constantă numită „masa de repaus".

Scanned with OKEN Scanner

(o particulă neutră, cu masă de repaus nulă, mişcîndu-se cu viteza luminii) se produce cu degajare de energie :

$$\underset{1{,}00866}{{}^{1}_{0}n} \rightarrow \underset{1{,}00727}{{}^{1}_{1}p^{+}} + \underset{0{,}00055}{{}^{0}_{1}e^{-}} + \underset{0}{{}^{0}_{0}\tilde{\nu}} + \underset{0{,}00076 \text{ u.a.m.}}{\Delta m} \qquad (1.1)$$

Diferenţa de masă Δm, de 0,00076 u.a.m. se repartizează conform relaţiei $\Delta E = c^2 \Delta m$, ca energie cinetică a particulelor rezultate, în special electronul şi antineutrinul. Această energie se poate calcula în jouli (J),

TABELA 1.3

Cîteva constante universale [30, 31]

Mărimea	Simbol	Valoare	Unităţi
Constanta lui Planck	h	$6{,}6262 \cdot 10^{-27}$	erg.s
Constanta lui Planck	h	$6{,}6262 \cdot 10^{-34}$	J.s
Viteza luminii în vid	c	$2{,}997925 \cdot 10^{-10}$	cm/s
Viteza luminii în vid	c	$2{,}997925 \cdot 10^{-8}$	m/s
Numărul lui Avogadro	$\mathcal{N}$	$6{,}02217 \cdot 10^{23}$	atomi/atom-gram
Numărul lui Avogadro	$\mathcal{N}$	$6{,}02217 \cdot 10^{23}$	molecule/mol
Unitatea atomică de masă	u.a.m. $= m_{^{13}C}/12$	$1{,}66053 \cdot 10^{-24}$	g
Unitatea atomică de masă	u.a.m. $= m_{^{13}C}/12$	931,48	MeV
Sarcina electrică elementară	e	$4{,}80325 \cdot 10^{-10}$	Fr.
Sarcina electrică elementară	e	$1{,}60219 \cdot 10^{-19}$	Coul.
Masa de rapaus a electronului	m_e	0,0005486	u.a.m.
Masa de rapaus a electronului	m_e	0,511004	MeV
Masa de repaus a protonului	m_p	1,0072766	u.a.m.
Masa de repaus a protonului	m_p	938,256	MeV
Masa de repaus a neutronului	m_n	1,0086652	u.a.m.
Masa de repaus a neutronului	m_n	939,553	MeV

ergi sau MeV, după cum urmează : energia echivalentă unei unităţi atomice de masă este după relaţia lui Einstein

$$1 \text{ u.a.m.} \cong \frac{1}{6 \cdot 10^{23}} \text{ g} = 1{,}66 \cdot 10^{-24} \text{ g} = 1{,}66 \cdot 10^{-24} \text{ g} \times \left(3 \cdot 10^{10} \frac{\text{cm}}{\text{s}}\right)^2 =$$

$$= 14{,}94 \cdot 10^{-4} \text{ erg} = 14{,}94 \cdot 10^{-11} \text{ J} = 931 \text{ MeV}.$$

Transformarea în unităţile uzuale, electron-volţi (eV) sau milioane de electron-volţi (MeV) se face prin relaţia

$$1 \text{ MeV} = 10^6 \text{ eV} = 10^6 \cdot 1{,}6 \cdot 10^{-19} \text{ coulombi} \times 1 \text{ volt} = 1{,}6 \cdot 10^{-13} \text{ J}.$$

Deci energia echivalentă masei unui electron este 0,00055 u.a.m. $\times$ $\times$ 931 MeV/u.a.m. = 0,51 MeV, iar energia degajată la transmutaţia neutronului în proton şi electron este de 0,00076 u.a.m. $\times$ 931 MeV/ u.a.m. = 0,68 MeV.

Masa exactă a nucleului este puţin mai mică decît suma maselor protonilor şi neutronilor care-l compun ; diferenţa de masă se traduce în energia de legătură degajată la formarea („fuziunea") nucleului din particulele elementare constituente.

Scanned with OKEN Scanner

Energia de legătură per nucleon se poate găsi uşor ; de ex. pentru He, masa atomică măsurată experimental exact (incluzînd cei doi electroni) este 4,00260 u.a.m., iar masa a doi neutroni şi doi atomi de hidrogen (ultimii incluzînd şi cei doi electroni) este $2 \times 1{,}00866 + 2(1{,}00727 + 0{,}00055) = 4{,}03296$ u.a.m. Deci energia de legătură per nucleon este $(4{,}03296 - 4{,}00260)/4 = 0{,}03036/4$ u.a.m. sau $1/4 \times 0{,}03036 \times 931 = 7{,}1$ MeV. Aceasta este aproximativ şi energia de legătură per nucleon la majoritatea nucleelor stabile ; la cele cu $Z = 35-60$ energia de legătură per nucleon este mai mare, şi anume de circa 8 MeV, avînd valoarea maximă de 8,8 MeV în jurul fierului ; la nucleele stabile mai grele, energia de legătură per nucleon scade, fiind iarăşi de circa 7 MeV la ^{235}U ; procedînd similar, se găseşte că la deuteriu, energia de legătură per nucleon este doar de 2,2 MeV.

Se defineşte „defectul de masă" (mai corect ar fi să se spună „deficitul de masă" sau „diferenţa de masă"), Δ, ca diferenţa între masa atomică exactă şi numărul de masă A. Raportînd această valoare la numărul de nucleoni A, se obţine „fracţiunea de împachetare" $P = \Delta/A$, care are valoarea minimă la nuclizii stabili cu $Z = 35-60$ din jurul fierului. Fisiunea nucleelor grele cum este ^{235}U în două nuclee mai uşoare duce la eliberarea energiei de fisiune provenită din faptul că la nucleele stabile mai uşoare din jurul fierului energia de legătură per nucleon este mai mare, iar fracţiunea de împachetare mai mică decît la nucleul iniţial de uraniu.

Fuziunea a două nuclee de deuteriu pentru a da un nucleu de heliu, sau fisiunea unui nucleu de uraniu-235 pentru a da două nuclee cu $Z = 35-60$ duce la degajarea prisosului de energie de legătură ; acestea sînt sursele energiei nucleare de fuziune (din stele şi soare, sau din bombele termonucleare), respectiv de fisiune (din reactoarele nucleare sau din bombele atomice).

1.2. RADIOACTIVITATEA

1.2.1. DEZINTEGRAREA BETA (β^-, β^+)

Conform ecuaţiei (1.1), neutronul liber este radioactiv avînd o perioadă de înjumătăţire de aproximativ 11 minute. În nucleu are însă loc un schimb continuu de mezoni-pi (pioni) între nucleoni (protoni şi neutroni) ducînd nu numai la stabilizarea nucleului ci şi a neutronilor înşişi. Acest schimb de pioni virtuali reprezintă forţele nucleare.

Procesul (1.2), invers relaţiei (1.1), adică transformarea unui proton într-un neutron, un pozitron şi un neutrino, necesită un consum de energie de 1,02 MeV :

$$ {}^1_1p^+ \longrightarrow {}^1_0n + {}^0_1e^+ + {}^0_0\nu \qquad (1.2) $$

În nuclee au loc procese analoage cu ecuaţiile (1.1) şi (1.2) şi anume :

$$ {}^A_ZM \longrightarrow {}^A_{Z+1}M + {}^0_{-1}e^- + {}^0_0\tilde{\nu} \quad \text{(dezintegrarea } \beta^-) \qquad (1.1a) $$

$$ {}^A_ZM \longrightarrow {}^A_{Z-1}M + {}^0_1e^+ + {}^0_0\nu \quad \text{(dezintegrarea } \beta^+) \qquad (1.2a) $$

Scanned with OKEN Scanner

Procesul (1.1a) are loc în nucleele care posedă un exces de neutroni față de raportul optim al zonei de stabilitate, transformînd acest exces în protoni și apropiind nucleul de zona de stabilitate. Acest proces mărește numărul atomic Z cu o unitate, menținînd neschimbat numărul de masă, deci în diagrama nuclizilor (tabela 1.1) nucleul-fiică apare pe diagonală în stînga sus.

Invers, nucleele cu deficit de neutroni față de raportul optim, suferă procesul (1.2a) apropiind de asemenea nucleul de zona de stabilitate. Și acest al doilea proces lasă neschimbat numărul de masă A al nuclizilor (izobari); dacă un singur proces β^+ sau β^- nu e suficient pentru a duce la un nuclid stabil, el este urmat de altul asemănător, și așa mai departe.

Fermi [18] a elaborat, pe baza proceselor (1.1) și (1.2) o teorie a dezintegrării beta care permite să se calculeze cu precizie mulțumitoare timpii de înjumătățire ai nuclizilor care emit fie electroni (negatroni, radiații beta minus), fie pozitroni (radiații beta plus). După o formulă a lui von Weizsäcker se pot calcula și energiile degajate în aceste dezintegrări beta, și se pot prevedea care sînt nuclizii stabili din fiecare familie de izobari.

În dezintegrările beta, energia se repartizează statistic asupra produselor de reacție. Cum neutrinii sau antineutrinii interacționează foarte slab cu materia, ei sînt practic nedecelabili, astfel încît inițial a apărut surprinzător faptul că particulele β^+ sau β^- nu aveau energii definite ci toate energiile cuprinse între zero și o anumită energie maximă E_{max}, caracteristică nuclidului respectiv; prin ipoteza lui Pauli asupra neutrinului, confirmată ulterior prin experiențe dificile, contradicțiile s-au rezolvat. Energia medie a unei particule beta este de circa o treime din E_{max}. Pozitronii de obicei nu se decelează ca atare întrucît ei se transformă rapid în fotoni gama prin interacție cu materia, întîlnind electroni, care sînt antiparticulele lor: o pereche electron-pozitron își transformă întreaga energie, inclusiv cea a maselor de repaus, în cîmp electromagnetic, prin procesul denumit impropriu „anihilare".

Dezintegrarea beta mai poate lua o a treia formă în afara celor două (β^+ și β^-) discutate mai sus, denumită captura electronică (CE) sau, mai puțin corect, captura K. Dacă energia unei transformări radioactive a unui nucleu cu deficit de neutroni este mai mică decît 1,02 MeV (energia echivalentă sumei maselor de repaus a unui electron și a unui pozitron), atunci nu se poate emite un pozitron cum cere ecuația (1.2), deci singura posibilitate de stabilizare a nucleului este captarea unui electron de pe orbitele cele mai apropiate de nucleu (cea mai apropiată, K, dînd captură de circa 10 ori mai des decît pătura următoare, L, dacă energia este suficientă; dacă nu, atunci sînt captați doar electroni L de energie mai joasă). Efectul este, ca și la emisia pozitronului, micșorarea numărului atomic Z cu o unitate, fără modificarea numărului de masă A; golul creat în pătura electronică K sau L duce la emiterea radiațiilor X caracteristice noului nuclid format, precum și a unor electroni cu energii comparabile cu ale radiațiilor X (electroni Auger). În captura electronică, se manifestă unul din puținele cazuri în care forma chimică a nuclidului influențează timpul de înjumătățire, modificînd energia electronilor: E. Segrè a arătat că $T_{1/2}$ pentru CE la ^7Be metalic este 53 zile, dar că la fluorură $^7BeF_2$ este de 57 zile.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.2. LEGILE DEZINTEGRĂRII RADIOACTIVE

Viteza dezintegrării radioactive a unei probe se mai numeşte activitatea probei, notată cu A. Ea este măsurată în numărul de dezintegrări din unitatea de timp, de ex. dezintegrări pe minut (dpm) ori pe secundă (dps). În cinstea pionierilor cercetării radioactivităţii, Marie şi Pierre Curie, se folosesc unităţile *curie* (Ci) şi submultiplii milicurie (mCi), microcurie (μCi) :

$$1\ \text{Ci} = 3{,}7 \cdot 10^{10}\ \text{dps}\ (\text{s}^{-1});\quad 1\ \text{mCi} = 3{,}7 \cdot 10^{7}\ \text{dps};\quad 1\ \mu\text{Ci} = 3{,}7 \cdot 10^{4}\ \text{dps}.$$

Valoarea $3{,}7 \cdot 10^{10}$ dps corespunde aproximativ activităţii unui gram de radiu în echilibru radioactiv cu produşii săi de dezintegrare, ceea ce constituie o activitate prea mare pentru practica medicală, de aceea se utilizează submultiplii mCi şi μCi.

O unitate folosită mult mai rar este 1 rutherford (Rd) $= 10^6$ dps, deci 1 mCi $= 37$ Rd.

În sistemul internaţional de unităţi de măsură, SI, unitatea de activitate radioactivă este denumită *becquerel* (Bq) : 1 Bq $=$ 1 dps $= 27{,}027 \times$ $\times\ 10^{-12}$ Ci ; 1 mCi $= 37$ MBq.

În sistemul de unităţi SI, timpul se măsoară în secunde ; se tolerează ca unităţi minutele, orele şi zilele, dar nu lunile sau anii (din cauza imprecizie, căci 1 lună $= 28-31$ zile, iar 1 an $= 365-366$ zile). Deci, lucrînd în SI, pentru ^{60}Co vom avea $T_{1/2} = 166$ Ms (megasecunde, 10^6 s) în loc de 5,25 ani ; pentru ^{131}I, $T_{1/2} = 700$ ks, tolerîndu-se şi valoarea echivalentă de 8,1 zile.

Dezintegrarea radioactivă a nucleelor într-o probă este un fenomen statistic, în care nu se poate prevedea care anume nucleu se va dezintegra la un anumit moment ; dezintegrarea ascultă însă de o lege probabilistică, care prevede o anumită probabilitate, p, ca un nucleu dintr-un ansamblu mare de nuclee să se dezintegreze în intervalul de timp Δt. Această probabilitate nu este influenţată de natura chimică a probei, de condiţiile externe (temperatură, presiune) sau de trecutul (istoria) probei, ci depinde doar de natura nuclidului respectiv prin aşa-numita constantă de dezintegrare λ (măsurată în unităţi reciproce de timp, de ex. s^{-1}) : $p = \lambda \cdot \Delta t$.

Dat fiind că evenimentul sigur are probabilitatea 1, probabilitatea ca un nucleu să nu se dezintegreze în intervalul Δt este

$$1 - p = 1 - \lambda \cdot \Delta t.$$

Probabilitatea unui eveniment compus fiind egală cu produsul probabilităţilor componente, condiţia ca nuclidul să nu se dezintegreze timp de n intervale este

$$(1 - p)^n = (1 - \lambda \cdot \Delta t)^n.$$

Dacă notăm timpul total cu $t = n \cdot \Delta t$ şi dacă facem intervalele Δt foarte mici, $\Delta t \to 0$, $n \to \infty$, iar expresia de mai sus devine

$$\lim_{n\to\infty} \left(1 - \lambda \frac{t}{n}\right)^n = \mathrm{e}^{-\lambda t},\ \text{căci}\ \lim_{n\to\infty} \left(1 + \frac{x}{n}\right)^n = \mathrm{e}^{x}.$$

Scanned with OKEN Scanner

Dacă într-o probă radioactivă existau inițial N_0 nuclee, din care rămîn nedezintegrate N nuclee după trecerea timpului t, raportul acestor mărimi nu depinde de mărimea probei inițiale ci doar de natura probei (λ) și de timp (t):

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\lambda t}, \text{ de unde } N = N_0 e^{-\lambda t}.$$

Cu alte cuvinte, numărul N de nuclee nedezintegrate descrește exponențial în raport cu timpul t (fig. 1.2).

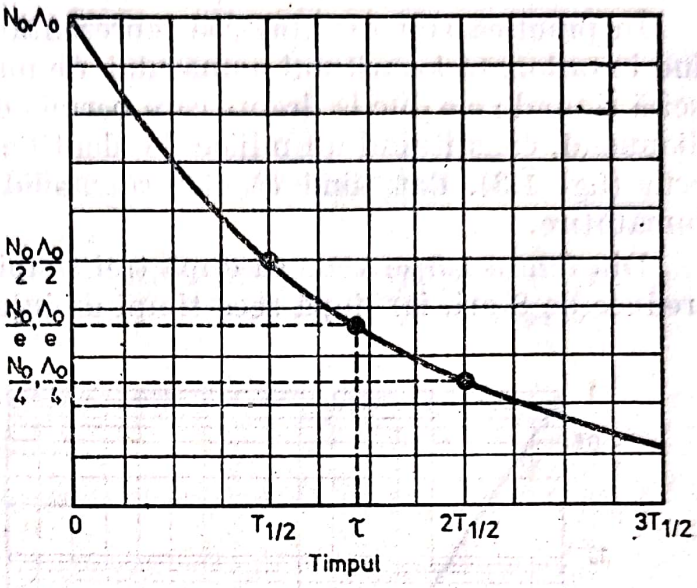


Fig. 1.2. — Scăderea exponențială a activității Λ a unui radionuclid în diagramă normală, Λ în funcție de timpul t. Similar scade numărul de nuclee inițial N_0

În practică, în locul constantei de dezintegrare λ se folosește o mărime mai intuitivă, variind invers proporțional cu aceasta, și anume timpul de înjumătățire, sau perioada de înjumătățire $T_{1/2}$, adică durata după care numărul de nuclee scade la jumătate, $N = \frac{N_0}{2}$:

$$\frac{N_0}{2} = N_0 e^{-T_{1/2}}, \text{ sau logaritmînd}$$

$$\ln \frac{1}{2} = -\lambda T_{1/2}, \text{ de unde}$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{2{,}303 \log 2}{\lambda} = \frac{2{,}303 \times 0{,}30103}{\lambda} = \frac{0{,}69315}{\lambda}.$$

Se poate arăta că durata medie de viață, T_m, a unui nucleu este ceva mai lungă decît $T_{1/2}$, și anume $T_m = 1/\lambda$: în intervalul dt se dezintegrează $dN = N_0 e^{-\lambda t}\, dt$ nuclee avînd viața t; viața medie va fi

$$T_m = \frac{\sum_i N_i t_i}{\sum_i N_i} = \frac{\int t\, dN}{\int dN} = \lambda \int_0^\infty t\, e^{-\lambda t}\, dt = \frac{1}{\lambda}.$$

Scanned with OKEN Scanner

Din legea dezintegrării radioactive se poate obține prin diferențiere viteza de dezintegrare sau activitatea Λ, adică scăderea numărului de nuclee, $-dN$, raportată la intervalul de timp, dt:

$$\Lambda = -\frac{dN}{dt} = \lambda N = \lambda N_0 e^{-\lambda t} = \Lambda_0 e^{-\lambda t}.$$

Și activitatea Λ a unei probe variază în timp după o lege exponențială, descrescînd de la activitatea inițială $\Lambda_0 = \lambda N_0$.

În practică sînt avantajoase reprezentările grafice semilogaritmice, avînd în ordonată logaritmul numărului de nuclee sau al activității, iar în abscisă timpul: ele duc la drepte care permit determinarea $T_{1/2}$ pentru un radionuclid, constituind un mijloc de identificare pentru nuclizii de viață scurtă (fig. 1.3), dat fiind că fiecare nuclid are tabelat timpul lui de înjumătățire.

Din figura 1.3 se vede că după trei timpi de înjumătățire activitatea se reduce de 8 ori, iar după zece timpi de înjumătățire ea se reduce de

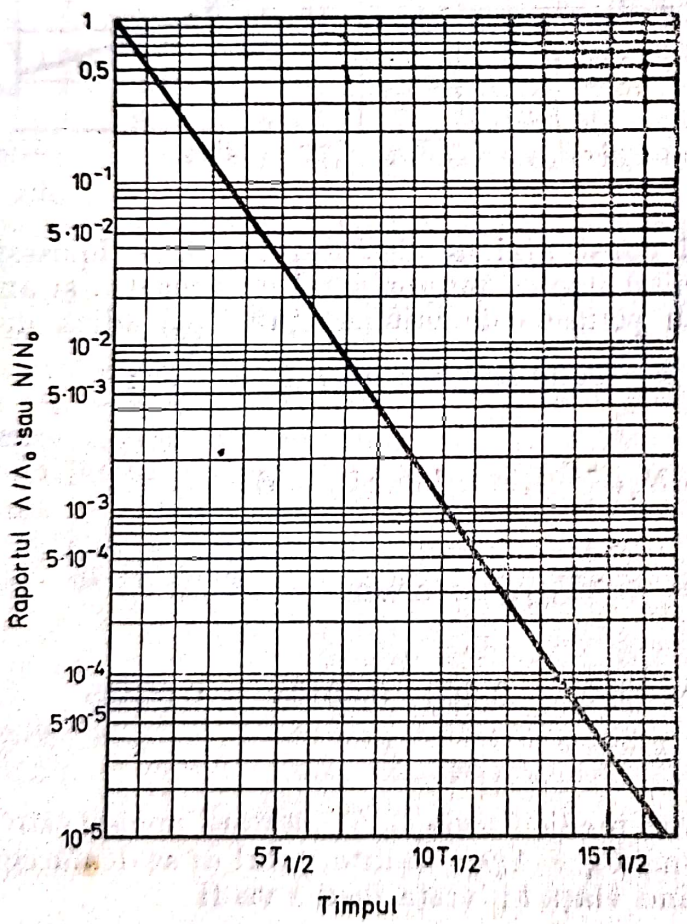


Fig. 1.3. — Scăderea liniară a activității unui radionuclid în diagramă semilogaritmică, log Λ în funcție de timpul t.

peste 1000 de ori. Calculul activității rămase după trecerea unui anumit timp se poate efectua după cum urmează: se cere de ex. să se calculeze activitatea unei probe de 100 mCi după trecerea a cinci timpi de înjumătățire.

Scanned with OKEN Scanner

Prima variantă:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} = A_0 e^{-\frac{0,693}{T_{1/2}}} = 100 \text{ mCi} \times e^{-0,693 \times 5} = 100 \text{ mCi} \times e^{-3,47} =$$
$$= 0,031 \times 100 \text{ mCi} = 3,1 \text{ mCi}$$

(valoarea $e^{-3,47}$ se găsește tabelată).

A doua variantă, unde j este numărul timpilor de înjumătățire:

$$A = \frac{A_0}{2^j} = \frac{100 \text{ mCi}}{2^5} = \frac{100}{32} \text{ mCi} = 3,1 \text{ mCi}.$$

1.2.3. ECHILIBRUL RADIOACTIV

Să considerăm dezintegrarea unui radionuclid (indicele 1) care duce la alt radionuclid (indicele 2). Specia 1 dispare după legea simplă

$$\frac{dN_1}{dt} = A_1 N_1, \quad N_1 = N_{1,0} e^{-\lambda_1 t},$$

dar specia 2 se formează concomitent cu dezintegrarea primeia, deci

$$\frac{dN_2}{dt} = \lambda_1 N_1 - \lambda_2 N_2 = \lambda_1 N_{1,0} e^{-\lambda_1 t} - \lambda_2 N_2.$$

Printr-o integrare mai complicată rezultă:

$$N_2 = \frac{\lambda_1 N_{1,0}}{\lambda_2 - \lambda_1} (e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}) + N_{2,0} e^{-\lambda_2 t}. \qquad (1.3)$$

În funcție de raportul celor doi timpi de înjumătățire, se disting trei cazuri:

(i) Dacă nuclidul-părinte are o viață mai lungă decît a nuclidului-fiică, $\lambda_1 < \lambda_2$, rezultă un echilibru tranzient, cînd nuclidul-fiică se dezintegrează aparent cu timpul de înjumătățire al nuclidului-părinte (fig. 1.4).

$$\lim_{t \to \infty} N_2 = \frac{\lambda_1 N_{1,0}}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{-\lambda_1 t}.$$

Pe această observație se bazează generatorii de radioizotopi atît de importanți pentru medicina nucleară (vezi acolo). Timpul t_{max} necesar pentru activitatea nuclidului-fiică pentru ca să atingă maximul plecînd de la zero (de ex. între două eluții succesive) este dat de anularea derivatei ecuației (1.3) în raport cu timpul, $t_{max} = \frac{2,303}{\lambda_2 - \lambda_1} \log \frac{\lambda_2}{\lambda_1}$, de ex. la $^{99}Mo - ^{99}Tc$. $\lambda_1 = \ln 2/96,2 = 0,01039 \text{ h}^{-1}$, $\lambda_2 = \ln 2/6 = 0,1155 \text{ h}^{-1}$, deci $t_{max} = 22,9$ h.

Scanned with OKEN Scanner

(ii) Cazul particular cînd $\lambda_1 \ll \lambda_2$ (nuclidul-părinte cu o viaţă foarte lungă) poartă numele de echilibru secular: în acest caz $\frac{N_1, \text{echil.}}{T_{1,1/2}} = \frac{N_2, \text{echil.}}{T_{2,1/2}}$.

Dacă se pleacă de la o cantitate $N_2 = 0$ la $t = 0$ în acest caz, după un timp de înjumătăţire $T_{2,1/2}$ se formează 1/2 din activitatea maximă (N_2, echil.); după 2 $T_{2,1/2}$ se formează 3/4 din aceasta, după 3 $T_{2,1/2}$ se

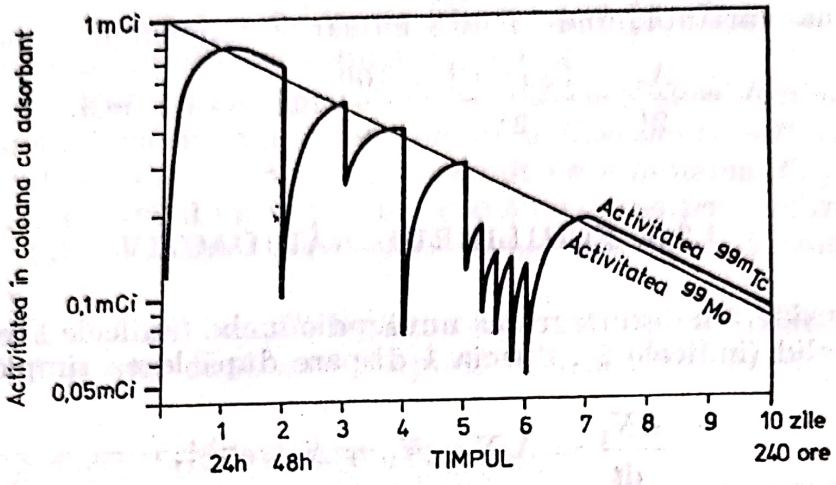


Fig. 1.4. — Echilibrul transient al perechii de radionuclizi: ^{99}Mo (părinte) — ^{99m}Tc (fiică); prima eluţie după 48 ore, următoarele trei după cîte 24 ore, următoarele patru după cîte 6 ore.

formează 7/8 din ea, după 4 $T_{2,1/2}$ se formează 15/16 din ea etc. Se vede că, de ex. la generatorul ^{113}Sn — ^{113m}In, sau la producerea unui radionuclid prin iradiere la ciclotron unde timpul de iradiere este scump, nu merită aşteptat mai mult de 2 — 2,5 timpi de înjumătăţire.

(iii) Al treilea caz, cînd nuclidul-părinte are o viaţă mai scurtă decît a nuclidului-fiică, $\lambda_1 > \lambda_2$, nu duce la echilibru şi nu are aplicaţii.

1.2.4. CARACTERISTICILE NUCLIZILOR

Este utilă o trecere în revistă a caracteristicilor nuclizilor, grupate în două categorii A şi B.

A. *Caracteristici comune izotopilor aceluiaşi element*

Proprietăţile care depind de învelişul electronic sînt foarte asemănătoare între izotopi, deşi cu aparatură fină se pot detecta efecte izotopice care reflectă diferenţa de masă. Astfel de proprietăţi sînt cele chimice, spectrele optice, proprietăţile electrochimice, echilibrele de fază, spectrele de raze X etc.

B. *Caracteristici diferite ale izotopilor aceluiaşi element*

1) Masa (deci implicit proprietăţile care depind direct de aceasta, cum sînt spectrele vibraţionale, viteza medie, drumul liber mijlociu şi viteza de difuzie la moleculele gazoase). Pe această caracteristică se bazează spectrograful de masă;

2) stabilitatea nucleară, reflectată în $T_{1/2}$ (cantitativ) şi împărţirea (calitativă) în nuclizi radioactivi (cu $T_{1/2}$ măsurabil) şi stabili (cu $T_{1/2}$ încă nemăsurabil de mare). La radionuclizi, natura şi energia radiaţiilor emise constituie o caracteristică suplimentară importantă;

3) secţiunea eficace de reacţie în diferite reacţii nucleare;

4) proprietăţi magnetice, depinzînd de spinul nuclear (nucleele par-pare au spin nul, cele par-impare sau impar-pare au un spin nuclear multiplu de $\frac{1}{2}$, cele impar-impare au spin nuclear întreg). Tot aici se încadrează şi momentul de cuadrupol.

Pe aceste caracteristici se bazează metoda rezonanţei magnetice nucleare pentru nucleele cu spin nenul, sau a rezonanţei cuadrupolare pentru nucleele cu moment de cuadrupol nenul;

5) stările excitate nucleare, permiţînd în anumite cazuri absorbţia de cuante γ fără recul (efect Mössbauer).

1.2.5. RADIOACTIVITATEA NATURALĂ

Toate elementele mai grele decît bismutul, cu $Z > 83$, sînt lipsite de nuclizi stabili. În natură se găsesc totuşi nuclizi radioactivi ai tuturor elementelor cu $Z = 84 - 92$, proveniţi din echilibrul radioactiv cu nuclizii primordiali $^{238}_{92}U$, $^{235}_{92}U$ şi $^{232}_{90}Th$ de viaţă lungă. Se ştie că dezintegrarea α micşorează numărul atomic Z cu 2, iar numărul de masă A cu 4, în timp ce dezintegrarea β lasă numărul de masă neschimbat *, dar modifică numărul atomic Z: emisia β^- îl măreşte pe Z cu 1, emisia β^+ şi captura electronică îl micşorează cu 1.

Astfel, un lanţ de dezintegrări α şi β modifică numărul de masă cu 4, respectiv 0 unităţi, formînd ceea ce se cheamă o serie radioactivă. Cei trei nuclizi primordiali menţionaţi mai sus sînt primii termeni ai celor trei serii radioactive denumite seria thoriului sau seria $4n$ (masele fiind multipli de 4), seria uraniului-radiului sau seria $4n + 2$ care începe cu ^{238}U, şi seria uraniului-actiniului sau seria $4n + 3$ care începe cu ^{235}U. Toate aceste serii se termină cu izotopi stabili ai plumbului, de numere de masă diferite. Cea de-a patra serie teoretic posibilă, seria $4n + 1$, nu apare în natură căci termenii ei au timpi de înjumătăţire mai mici de 10^7 ani: aceasta este seria care începe la ^{241}Pu, are ca nuclizi de viaţă cea mai lungă ^{237}Np($T_{1/2} = 2{,}2 \cdot 10^6$ a) şi ^{233}U($T_{1/2} = 1{,}6 \cdot 10^5$ a) şi se numeşte de aceea seria neptuniului; ea se termină la un izotop stabil al bismutului.

Unii dintre nuclizii primordiali enumeraţi în tabela 1.1, alcătuiesc mici serii radioactive ** în afara celor trei mari serii radioactive naturale menţionate mai sus şi a celei de-a patra serii, artificiale, a neptuniului. Nuclizii primordiali şi radionuclizii aflaţi în echilibru secular cu ei constituie

---

* Bineînţeles că suma maselor exacte ale produşilor reacţiilor nucleare este puţin mai mică decît masa nucleului iniţial, conform echivalenţei între masă şi energie; aceste diferenţe de masă, ca şi masele electronilor sau pozitronilor, sînt neglijabile faţă de masa nucleonilor, de aceea nu se reflectă în variaţia lui A. Numărul de masă A este definit fie ca masa nucleului sau nuclidului în unităţi atomice de masă rotunjite la numere întregi, fie ca numărul de nucleoni al nucleului.

** $^{190}Pt \rightarrow {}^{186}Os \rightarrow {}^{182}W$ stabil; $^{152}Gd \rightarrow {}^{148}Sm \rightarrow {}^{144}Nd \rightarrow {}^{140}Ce$ stabil.

principalele surse radioactive naturale. Pînă în 1934 cînd s-a descoperit radioactivitatea artificială, ei erau singurii radionuclizi cunoscuţi. Datorită radioactivităţii foarte slabe a radionuclizilor primordiali (activitatea radioactivă fiind invers proporţională cu timpul de înjumătăţire) detectarea radioactivităţii lor este anevoioasă; de aceea primele studii s-au efectuat cu radioizotopi de viaţă mai scurtă din seriile radioactive naturale, ce posedă o radioactivitate mai intensă : ^{226}Ra, ^{210}Po.

Mai există în natură şi radioizotopi care nu provin din radionuclizii primordiali, ci sînt produşi în mod continuu de către radiaţia cosmică : ^{3}H sau T ($T_{1/2} = 12{,}35$ ani) şi ^{14}C ($T_{1/2} = 5736$ ani). Tritiul provine fie ca atare din radiaţia cosmică, fie prin reacţii de spalaţie *. Concentraţia staţionară mică a radiocarbonului ^{14}C în atmosferă permite datarea materialelor organice de proveniantă biologică cu o vechime de 400 — 20 000 ani.

După 1945, ca rezultat al exploziilor nucleare în atmosferă, concentraţiile ^{14}C şi ^{3}H în emisfera nordică a pămîntului au crescut cu mai mult de 100% faţă de concentraţia naturală care se menţinuse constantă timp de sute de milenii.

Nu este întîmplător faptul că toţi radionuclizii beta-activi naturali emit electroni, nu pozitroni : provenind din serii radioactive care încep cu elemente grele, unde stabilitatea nucleară reclamă un exces de neutroni, radioizotopii naturali au şi ei exces de neutroni, deci vor fi β^--activi. Radioizotopii artificiali pot fi atît β^--activi (produşi din reacţii cu neutroni în reactoare nucleare) cît şi β^+-activi (produşi din reacţii cu nuclee de ^{1}H, ^{2}D sau ^{4}He în acceleratoare de particule încărcate electric).

1.2.6. SCHEME DE DEZINTEGRARE [26, 37]

Se obişnuieşte să se reprezinte transformările radioactive prin scheme de dezintegrare care subînţeleg pe verticală scala energiilor, iar pe orizontală scala numerelor de ordine. Dezintegrarea β^-, cu emisie de

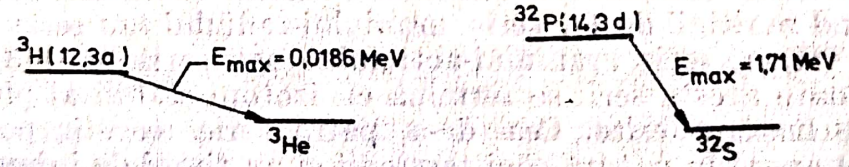


Fig. 1.5. — Schema de dezintegrare β^- a tritiului, ^{3}H, şi a fosforului — 32, ^{32}P.

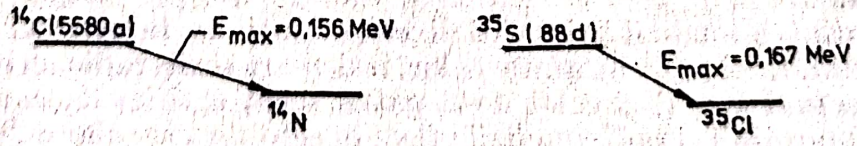


Fig. 1.6. — Schema de dezintegrare a ^{14}C şi a ^{35}S, prin emisie β^-.

negatroni (electroni) duce la creşterea numărului de ordine cu o unitate, de aceea ea se reprezintă ca în figurile 1.5 şi 1.6; liniile groase orizontale figurează energiile stărilor iniţiale şi finale, iar cele subţiri oblice reprezintă tranziţiile.

* Paragraful 1,2,10.

Dezintegrarea β^+ (emisia de pozitroni) și captura electronică (CE) duc la scăderea numărului de ordine cu o unitate, de aceea ele se reprezintă ca în figurile 1.7 și 1.8.

De remarcat că din energia totală, se consumă 1,02 MeV pentru materializarea pozitronului (care nu preexistă în nucleu); această energie

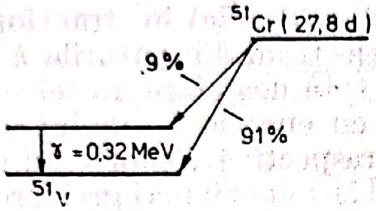


Fig. 1.7. — Schema de dezintegrare a ^{51}Cr prin captură electronică.

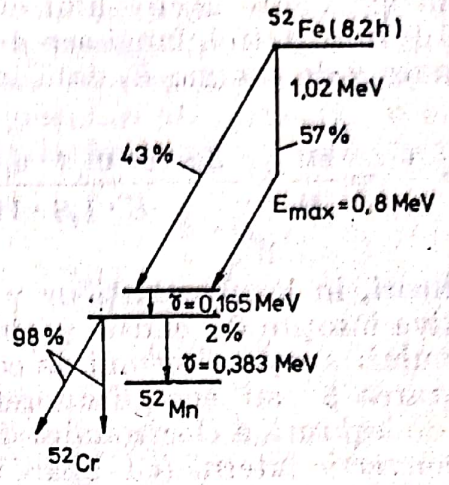


Fig. 1.8. — Schema de dezintegrare a ^{52}Fe prin captură electronică și emisie β^+.

este figurată în figura 1.8 ca o porțiune verticală. Există și unii radionuclizi, de obicei impar-impari care dau ambele feluri de dezintegrări, β^+ și β^-, de ex. ^{64}Cu (fig. 1.9).

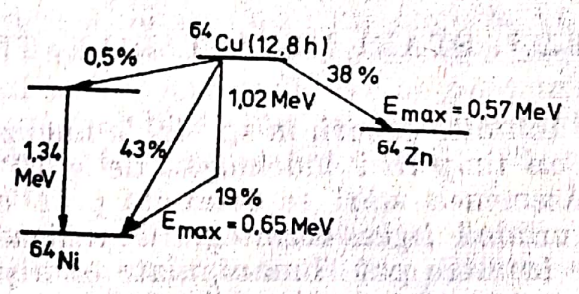


Fig. 1.9. — Schema de dezintegrare a ^{64}Cu, nucleu impar-impar, prin captură electronică, emisie β^- și β^+.

1.2.7. RADIAȚIA GAMMA ȘI CONVERSIA INTERNĂ

În schemele de dezintegrare prezentate mai sus, unii nuclizi nu au un singur nivel de energie, ci mai multe; nivelul inferior este cel fundamental, celelalte sînt nivele excitate ale nucleului. Într-un timp extrem de scurt, de ordinul 10^{-12} s, aceste stări excitate pierd excesul de energie sub formă de radiații electromagnetice (fotoni gamma) trecînd în starea fundamentală. Energiile fotonilor γ emiși sînt discrete, corespunzînd diferențelor între nivelele energetice nucleare, exact așa cum atomii emit sau absorb energii luminoase discrete corespunzînd diferențelor între nivelele energetice electronice. Ultimele energii se măsoară însă în electron-volți corespunzînd forțelor de legătură chimice, în timp ce cuantele γ se măsoară în milioane de electron-volți, corespunzînd forțelor nucleare, incomparabil mai puternice.

Scanned with OKEN Scanner

Energia E a oricărei radiaţii electromagnetice (radio, lumină, radiaţie X sau gamma) este proporţională cu frecvenţa ei, ν, constanta de proporţionalitate fiind denumită constanta lui Planck, $h = 6{,}62 \cdot 10^{-27}$ erg. secundă, $E = h\nu$.

Între lungimea de undă λ a radiaţiei *, şi frecvenţa ei, ν, există binecunoascuta relaţie $\lambda\nu = c$, unde c este o altă constantă universală, viteza de propagare a cîmpului electromagnetic (viteza luminii) în vid, $c = 3 \cdot 10^8$ m/s. Astfel, lungimea de undă în angstromi (1 Å $= 10^{-10}$ m) a unei cuante γ de energie E, dată în keV, este

$$\lambda(\text{Å}) = \frac{c}{\nu} = \frac{ch}{E} = \frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s} \cdot 6{,}62 \cdot 10^{-27} \text{ erg. s}}{E \cdot 1{,}6 \cdot 10^{-9} \text{ erg/keV}} \cdot 10^{10} \frac{\text{Å}}{m} = \frac{12{,}4}{E(\text{keV})}.$$

Uneori, în locul radiaţiilor γ (sau alături de ele) în transformările radioactive însoţite de emisie γ, sînt emişi electroni din păturile K sau L ale atomului. Aceşti electroni de conversie, spre deosebire de cei emişi în dezintegrarea β^-, au energii discrete, egale cu energia fotonului γ minus energia de legătură a electronului în pătura respectivă. Fenomenul descris, numit conversie internă (CI) apare în special la nuclizii mai grei, precum şi în cazul cînd durata de viaţă a stării excitate nucleare este relativ mare (vezi mai jos). Un asemenea caz este al ^{99m}Tc care emite atît cuante γ cît şi electroni de conversie internă. Raportul între vitezele procesului de conversie internă şi procesului de emisie se numeşte coeficientul de conversie internă α ($0 < \alpha < \infty$). Golul rămas în păturile K sau L provoacă şi apariţia de radiaţii X şi de electroni Auger.

1.2.8. STĂRI METASTABILE, TRANZIŢII IZOMERE

În anumite cazuri, în special la nuclizii mai grei, unele stări excitate persistă un timp mai îndelungat, de la 10^{-6} s pînă la durate de ordinul zilelor. Asemenea stări se desexcită prin emisie γ şi, eventual, conversie internă, urmînd legea dezintegrării radioactive. Dat fiind că aceste stări nucleare izomere pot fi manipulate ca nişte radionuclizi obişnuiţi, ele sînt denumite stări metastabile şi sînt notate prin simbolul „m" urmînd numărul de masă, de ex. ^{99m}Tc pentru starea metastabilă cu $T_{1/2} = 6$ h a technetiului-99, care se desexcită emiţînd cuante γ şi electroni de conversie internă dînd starea fundamentală ^{99}Tc cu $T_{1/2} = 2{,}1 \cdot 10^5$ a, emiţător β^- şi γ.

Primele observaţii asupra izomeriei nucleare datează de la începutul studiului radioactivităţii naturale, cînd abia se clarifica natura izotopilor şi cînd un nuclid era caracterizat în primul rînd prin $T_{1/2}$ şi prin radiaţia emisă, fără a i se cunoaşte exact proprietăţile chimice; în seria uraniului-radiului, se obţinuseră „uraniul X_2" cu $T_{1/2} = 1{,}2$ minute şi „uraniul Z" cu $T_{1/2} = 6{,}7$ ore, ambii provenind din acelaşi precursor prin dezintegrare β şi transformîndu-se tot prin dezintegrări β în acelaşi succesor; în realitate, era vorba de două stări izomere al protactiniului — 234.

---

* Conform uzanţelor, se foloseşte din păcate aceeaşi notaţie, λ, şi pentru constanta radioactivă şi pentru lungimea de undă; de asemenea, neutrinul şi frecvenţa se notează ambele prin ν.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.9. DEZINTEGRAREA ALFA

Cu toate că nuclizii emiţători alfa nu au aplicaţii biomedicale, ei vor fi menţionaţi pe scurt căci au fost printre primii radioizotopi studiaţi, apărînd în seriile radioactive naturale.

La radionuclizii cu $Z < 60$, transformările nucleare obişnuite sînt de tip β^+ şi β^- care duc la apropierea de zona de stabilitate nucleară modificînd doar natura, nu şi numărul nucleonilor din nucleu. La nuclizii cu $Z > 60$, coeziunea nucleară nu mai poate compensa puternica repulsie electrostatică, din care cauză apar şi fragmentări ale nucleului cu micşorarea numărului de nucleoni. Cea mai simplă fragmentare este emisia unei

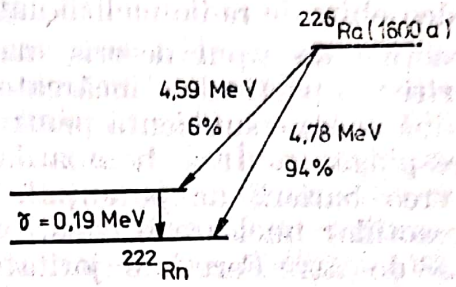


Fig. 1.10. — Schema de dezintegrare α şi γ a ^{226}Ra.

particule α, adică a unui nucleu de ^4He compus din doi protoni şi doi neutroni. Cum numărul 2 de nucleoni este un număr magic, particula alfa are o mare stabilitate, fiind un nucleu dublu magic. În urma unei dezintegrări α, numărul atomic Z scade cu două unităţi, iar numărul de masă A scade cu 4 unităţi, tranziţia urmînd aproximativ direcţia zonei de stabilitate nucleară (fig. 1.1). De aceea, cu puţine excepţii, o dezintegrare α nu apropie radionuclidul de zona de stabilitate, deci nu duce la un nuclid stabil, ci tot la un radionuclid (fig. 1.10). Acest tip de dezintegrare, la elementele cu $Z > 83$ care nu mai au nuclizi stabili, devine predominant şi se plasează în prelungirea zonei de stabilitate nucleară a elementelor mai uşoare. Altfel spus, dintre nuclizii (toţi radioactivi) cu $Z > 83$, cei mai „stabili" sînt radionuclizii α-activi.

Spre deosebire de radiaţiile β care au energii variind continuu de la zero la o energie maximă, radiaţiile α au energii discrete, de obicei mari (peste 4 MeV).

1.2.10. REACŢII NUCLEARE

Cînd utherford, în 1919, a studiat parcursul particulelor α în aer, a observat că, chiar la grosimi ale stratului de aer suficiente pentru a opri toate particulele α, se mai observau scintilaţii pe un ecran de sulfură de zinc. Acestea erau însă datorate unor protoni de mare energie. Aceşti protoni nu puteau proveni decît dintr-o reacţie nucleară; s-a dovedit că aceasta era:

$$^{14}_{7}N + {}^{4}_{2}He \longrightarrow {}^{1}_{1}H + {}^{17}_{8}O$$

sau prescurtat

$$^{14}N(\alpha, p)\,^{17}O$$

Scanned with OKEN Scanner

În scrierea prescurtată a unei reacţii nucleare se scrie mai întîi nucleul ţintă, apoi în paranteze particula bombardantă, urmată de particula uşoară emisă, iar la urmă, în afara parantezei, nucleul rezultat. De observat că la reacţiile nucleare, ca şi la reacţiile chimice, se conservă atît masa cît şi sarcina, adică rămîn nemodificate înainte şi după reacţie atît suma indicilor superiori (A) cît şi a celor inferiori (Z). În realitate, date fiind energiile puse în joc, masa nu se conservă exact ci doar aproximativ.

Primul radionuclid artificial a fost obţinut în 1934 de Frédéric şi Irène Joliot-Curie prin reacţia

$$^{27}_{13}\mathrm{Al} + {}^{4}_{2}\mathrm{He} \longrightarrow {}^{30}_{15}\mathrm{P} + {}^{1}_{0}n \quad \text{sau prescurtat:} \quad {}^{27}\mathrm{Al}(\alpha, n)\,{}^{30}\mathrm{P}.$$

Spre deosebire de radionuclizii naturali, ^{30}P emite pozitroni.

În reacţiile de tipul descris mai sus: bombardarea unui nucleu încărcat pozitiv cu particule α încărcate tot pozitiv, particula bombardantă trebuie să aibă energie suficientă pentru a învinge bariera electrostatică de potenţial respingător. Însă bombardarea unui nucleu cu neutroni nu întîmpină vreo barieră de potenţial, de aceea agentul preferat pentru realizarea reacţiilor nucleare îl constituie azi neutronii, folosiţi cu succes încă din 1938 de către Fermi. Majoritatea reacţiilor nucleare cu neutroni se realizează în reactoare nucleare care constituie surse mult mai ieftine şi intense de neutroni decît acceleratoarele de particule încărcate electronic.

Se deosebesc neutronii rapizi (cu viteze şi energii mari, rezultaţi în urma fisiunii) de neutronii lenţi sau termici (cu viteze micşorate prin ciocniri repetate cu atomi ai moderatorului, energiile acestor neutroni fiind de ordinul a 0,025 eV, adică al energiei moleculelor la temperatura ambiantă). La energii foarte mari ale particulelor incidente (de ordinul sutelor de MeV) reacţiile nucleare duc la spargerea *(spalaţia)* nucleului-ţintă în multe fragmente mici.

Cea mai comună reacţie nucleară cu neutroni este „activarea" ${}^{A}_{Z}\mathrm{M}(n, \gamma)\,{}^{A+1}_{Z}\mathrm{M}$ prin care un nucleu stabil ^{A}M absoarbe un neutron transformîndu-se prin emisie γ într-un nucleu izotopic $^{A+1}$M cu numărul de masă mai mare cu o unitate; cel mai adesea, acest nou nucleu cu exces de neutroni este emiţător β^- şi γ. Analizînd cu un spectrometru de radiaţii γ energiile acestor fotoni γ, se poate identifica, după tabelele care dau energiile γ ale tuturor nuclizilor cunoscuţi, natura elementului M; această „analiză prin activare" sau „radioactivare" [38—40] permite analiza calitativă şi cantitativă, simultan, rapid şi simplu, a unui mare număr de elemente. În anumite cazuri, ea poate atinge sensibilităţi neegalate de nici o altă metodă. Analiza rocilor lunare a fost efectuată iniţial prin radioactivare.

La acelaşi număr de atomi, sau la cantităţi egale de materie, energiile puse în joc de reacţiile nucleare sînt de cîteva sute de mii de ori mai mari decît cele ale reacţiilor chimice. Pe de altă parte însă, reacţiile nucleare sînt evenimente mult mai rare, în primul rînd din cauza dimensiunilor mult mai mici ale nucleelor (10^{-14} —10^{-15} m) faţă de ale învelişurilor electronice ale atomilor (aproximativ de 10^{-10} m, adică 1 Å).

Caracterizarea eficienţei sau randamentului reacţiilor nucleare se face de aceea prin aşa-numitele „secţiuni eficace" de reacţie. Acestea au dimensiunile unor arii şi pot fi concepute, în primă aproximaţie, ca suprafaţa pe care o oferă nucleul-ţintă particulei incidente. Unitatea de măsură pentru aceste secţiuni eficace este 1 barn $= 10^{-28}$ m^2, şi submultiplii săi,

Scanned with OKEN Scanner

1 mb $= 10^{-31}$ m^2. Trebuie însă ţinut seama de faptul că unul şi acelaşi nucleu are secţiuni eficace care diferă mult în raport cu natura şi energia particulei incidente, de aceea modelul intuitiv al unei secţiuni a nucleului este doar o aproximaţie grosieră.

Pentru reacţiile cu neutroni lenţi, secţiunile eficace σ sînt tabelate [41]. Ele permit calcularea numărului nucleelor rezultate în unitatea de timp în urma activării printr-un flux Φ de neutroni (neutroni/m$^2 \cdot$ s) după relaţia

$$\Phi(1 - e^{-n\sigma x}),$$

unde n este numărul nucleelor-ţintă în unitatea de volum, σ este secţiunea eficace, iar x este grosimea ţintei; trebuie avut grijă ca lungimile să fie exprimate în aceleaşi unităţi de măsură.

Studiul efectelor chimice asociate proceselor nucleare (chimia „atomilor fierbinţi"), al reacţiilor nucleare şi al radioizotopilor (radioelementelor, radionuclizilor) se numeşte radiochimie [3, 23, 25, 41—47], iar studiul efectelor chimice ale radiaţiilor nucleare se numeşte chimia radiaţiilor (chimie sub radiaţii) [48—60]. Iniţial, ambele domenii erau cuprinse sub denumirea de chimie nucleară; nici acum nu există un consens cu privire la folosirea denumirii de radiochimie sau chimie nucleară [10, 11, 13, 15, 24, 27].

1.2.11. FISIUNEA ŞI FUZIUNEA NUCLEARĂ

La cîţiva nuclizi foarte grei, cu $Z \geqslant 90$ şi cu $Z^2/A > 35$, fragmentarea nucleului poate lua un alt curs şi anume ruperea în două fragmente grele plus un număr de 0—3 neutroni, proces denumit fisiune nucleară spontană. Cei mai importanţi nuclizi care prezintă acest mod de fragmentare sînt formaţi prin capturarea unui neutron lent de către ^{235}U sau ^{239}Pu ori a unui neutron rapid de către ^{232}Th. Primele fisiuni au fost demonstrate de O. Hahn şi colaboratori în 1939 la ^{235}U [61]. Pe baza fisiunii, însoţită de emisia a 2—3 neutroni, poate avea loc o reacţie nucleară înlănţuită, cu degajarea uriaşei energii nucleare rezultată din repartizarea forţelor nucleare între două nuclee mai stabile decît un singur nucleu greu (echivalentă cu diferenţa de masă între nucleul iniţial plus neutronul incident şi nucleele-fragment plus neutronii rezultaţi după fisiune), aşa cum s-a arătat în paragraful 1.1.7.

În practică, reactoarele nucleare termice funcţionează pe baza uraniului [62, 63]: un nucleu de ^{235}U (0,72% din uraniul natural) dă cu un neutron lent o fisiune indusă ducînd la două fragmente de fisiune inegale, cu numere de ordine Z prezentînd două maxime (fig. 1.11), precum şi la 2,5 neutroni (în medie), purtînd în total o energie de circa 200 MeV. Neutronii după încetinirea cu un moderator (grafit, apă ori apă grea) provoacă o nouă fisiune ş.a.m.d. Pentru ca neutronii să nu se piardă înainte de a fi dat reacţia nucleară, cantitatea de ^{235}U trebuie să depăşească o aşa-numită masă critică, care este de cîteva kilograme. Uraniul natural mai conţine 99,28% uraniu-238 care captează neutronii dînd următoarele reacţii nucleare:

$$\underset{T_{1/2} = 4{,}47 \cdot 10^9 \text{ a}}{^{238}\text{U}} \quad (n, \gamma) \quad \underset{23{,}5 \text{ min}}{\text{U}^{239}} \xrightarrow{\beta^-} \underset{2{,}355 \text{ d}}{^{239}\text{Np}} \xrightarrow{\beta^-} \underset{2{,}4 \cdot 10^4 \text{ a}}{^{239}\text{Pu}} \xrightarrow{\alpha} \underset{7{,}04 \cdot 10^8 \text{ a}}{^{235}\text{U}}$$

Bilanțul neutronilor într-un reactor nuclear trebuie să țină seama de pierderile lor în exterior, de absorbția lor în combustibilul nuclear și moderator (secțiunile eficace sînt 332 mb pt. ^{1}H, 0,53 mb pt. ^{2}D, 3,4 mb pt. ^{12}C și 0,18 mb pt. ^{16}O, dar termalizarea neutronilor se face optim de către nuclee cu masa cît mai mică, adică apropiată de a neutronului, deci eficiența H> D> C). De aceea pot funcționa cu uraniu natural

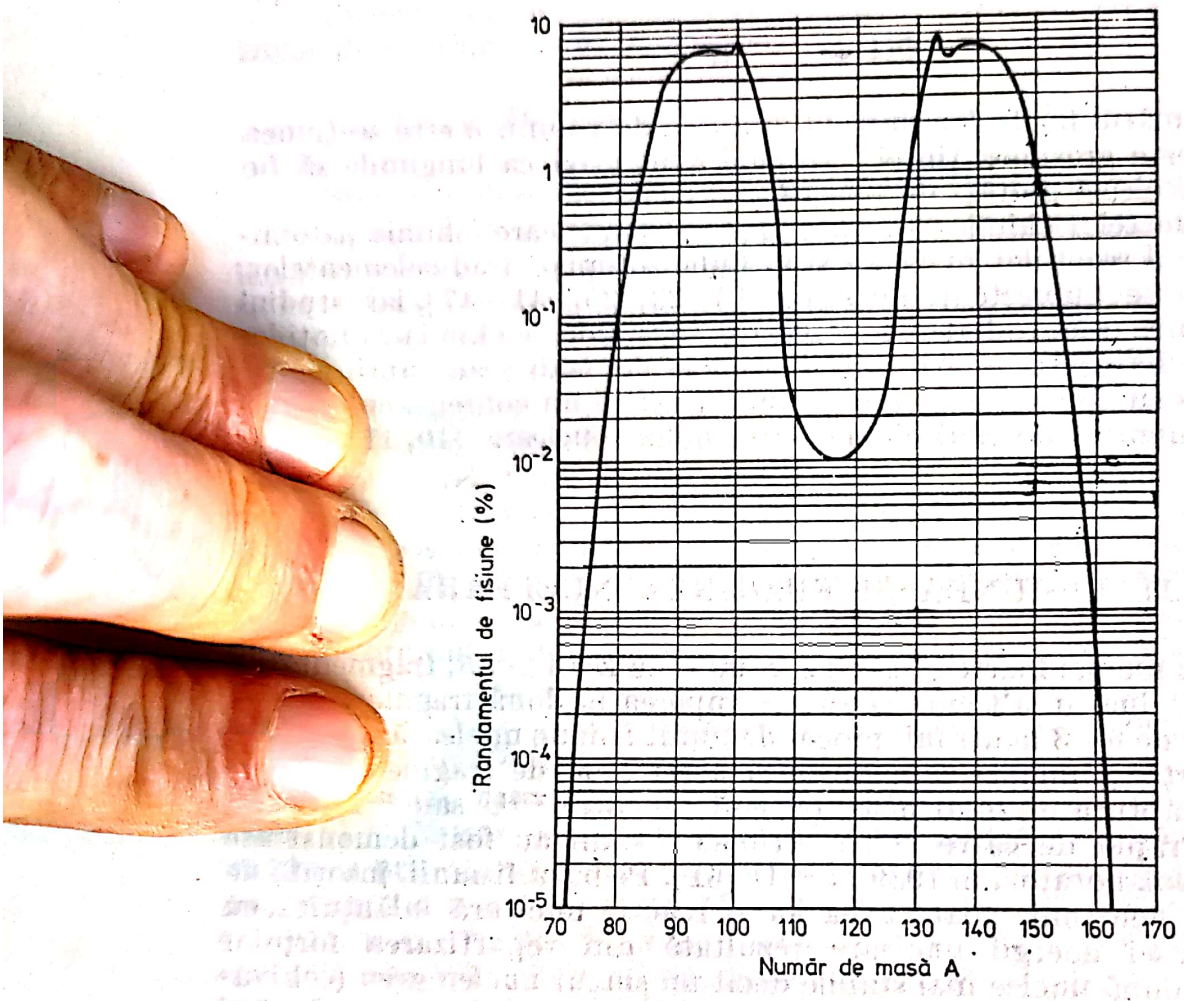


Fig. 1.11.—Abundența produșilor de fisiune ai ^{235}U în funcție de numărul lor atomic Z.

doar reactoarele moderate cu D_2O sau cu grafit (acestea din urmă au doar un interes istoric, avînd volume prea mari din cauza parcursului de moderare prea lung). Reactoarele moderate cu H_2O necesită uraniu îmbogățit în ^{235}U, deoarece protonii captează o parte din neutroni pentru a forma deuteriu.

Rezervele actuale de uraniu-235 din scoarța pămîntului nu vor putea asigura aprovizionarea cu energie a pămîntului decît 1—2 secole, de aceea s-au căutat alte soluții pentru această problemă-cheie a omenirii, energia. Cea realizabilă în viitorul apropiat este a reactoarelor rapide reproducătoare, în care neutronii proveniți din fisiunea ^{235}U îmbogățit nu mai sînt termalizați, ci ei sînt captați în ^{238}U ducînd la ^{239}Pu care poate da și el fisiune indusă. În acest fel, pe seama ^{238}U, mult mai abundent decît ^{235}U se va putea satisface cerința de energie timp de mai multe secole.

Scanned with OKEN Scanner

Soluţia definitivă a problemei energiei o va furniza însă nu fisiunea nucleelor grele, ci fuziunea nucleelor uşoare, în speţă a izotopilor hidrogenului. Aceasta este sursa de energie care asigură strălucirea stelelor, în particular a soarelui; ea se bazează, ca şi fisiunea, pe faptul că prin contopirea a doi atomi de deuteriu (cu o energie de legătură per nucleon de numai 2,2 MeV, vezi § 1.1.7) într-un atom de heliu (cu o energie de legătură per nucleon de 7,1 MeV) se degajă excesul de energie de $4 \times (7{,}1 - 2{,}2) = 19{,}6$ MeV. Această energie termonucleară, practic nelimitată (există destul deuteriu în oceane pentru a satisface cerinţele de energie pentru mai multe milenii), încă nu se poate controla, deşi se caută soluţii tehnice.

1.3. INTERACŢIA RADIAŢIILOR NUCLEARE CU MATERIA

La ciocnirea între două obiecte macroscopice sau microscopice, se deosebesc două tipuri principale de interacţii: elastice şi neelastice. Cînd suma energiilor cinetice ale celor două corpuri care interacţionează nu se schimbă în urma interacţiei, energia cinetică nu se transformă în alte forme de energie şi interacţia se numeşte elastică. Cînd însă energia cinetică se transformă în alte forme de energie (chimică şi electrică în cazul ionizărilor şi excitărilor moleculelor sub acţiunea radiaţiilor nucleare), ciocnirile se numesc neelastice. Şi reacţiile nucleare sînt nişte ciocniri neelastice, dar ele au fost discutate mai înainte şi nu se va reveni aici asupra lor.

Radiaţiile nucleare dau cu materia (gazoasă, lichidă sau solidă) atît interacţii elastice cît şi neelastice. Clasificăm radiaţiile nucleare sau radiaţiile ionizante după cum urmează:

A. *Radiaţii corpusculare* (particule cu masă de repaus nenulă):

1) particule grele, încărcate electric (nuclee ale atomilor), ca protoni, deuteroni, particule α: preponderent interacţii neelastice cu electronii mediului străbătut;

2) particule uşoare, încărcate electric (electroni, pozitroni): preponderent interacţii neelastice cu electronii şi nucleele mediului străbătut;

3) particule grele, fără sarcină (neutroni): preponderent interacţii elastice cu nucleele mediului străbătut;

4) mezonii şi antiparticulele nu apar decît la energii foarte mari, de aceea nu vor fi discutaţi.

B. *Radiaţii electromagnetice* (particule cu masă de repaus nulă):

1) cuante (fotoni) de radiaţii X şi γ; nu există o demarcaţie netă între aceste două tipuri de fotoni, ci doar o graniţă convenţională (vezi mai departe); interacţiile sînt preponderent neelastice cu electronii mediului străbătut;

2) radiaţia neutrinică nu se va discuta aici, întrucît nu are deocamdată aplicaţii.

Se vor trece în revistă pe rînd principalele aspecte ale interacţiilor de tip A.1, A.2, A.3, şi B.1 [64].

Scanned with OKEN Scanner

Reducerea intensității (atenuarea) unui fascicul de radiații nucleare la trecerea prin materie este rezultatul a două procese: împrăștierea datorită ciocnirilor elastice și absorbția datorită ciocnirilor neelastice. Coeficientul de atenuare, măsurat experimental, este suma coeficienților parțiali ai împrăștierii și absorbției.

Atenuarea prezintă următoarele tipuri principale:

1) atenuarea exponențială, în care într-un act de absorbție o particulă pierde toată energia (sau o mare parte din ea); probabilitatea fiind constantă, rezultă o lege exponențială (exemple tipice: fotonii și neutronii);

2) atenuarea cu parcurs R, în care într-un act de absorbție particula pierde puțin din energie; la un fascicul monoenergetic, parcursul fiecărei particule este practic constant, intensitatea fasciculului se menține practic constantă pînă la sfîrșitul parcursului unde scade brusc (exemplu tipic: particulele α);

3) cazul intermediar (exemplu tipic radiațiile β^+ și β^-) este al unor radiații cu parcurs, dar a căror intensitate I nu scade brusc la sfîrșitul parcursului ci treptat, aproape exponențial, din cauză că fasciculul nu e monoenergetic și că, la o ciocnire, electronii pierd o fracție apreciabilă a energiei.

Aceste trei cazuri se caracterizează prin raportul între parcursul, R, și distanța de înjumătățire a intensității fasciculului, $d_{1/2}$ indicată în figura 1.12. Parcursul este notat aici cu d_{max}.

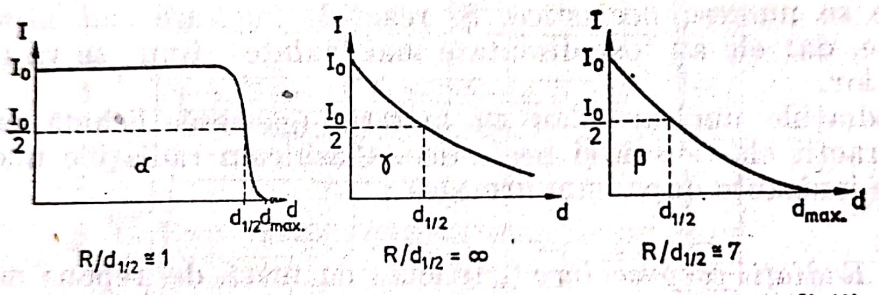


Fig. 1.12. — Scăderea intensității I a unui flux colimat de radiații nucleare α, β sau γ care străbat o distanță d în materie.

1.3.1. INTERACȚII CU PARTICULE GRELE, ÎNCĂRCATE ELECTRIC (A.1)

Sursa lor poate fi fie un radionuclid emițător de particule α, fie un accelerator de particule (vezi acolo) pentru protoni, deuteroni și particule α (sau helioni-4, $^4He^{2+}$, căci există și helioni-3, $^3He^{2+}$).

La trecerea unor asemenea particule de masă A și energie E prin materie, ele interacționează puternic cu electronii atomilor și moleculelor din mediul străbătut (acești electroni au masa m_e), cedîndu-le energia $\Delta E = 4m_eE/A$. Această energie ΔE produce saltul electronilor pe orbite mai depărate de nucleu (excitări) sau îndepărtarea completă a electronilor din atom (ionizări ducînd la formarea unei perechi de ioni, adică electronul plus atomul sau molecula rămasă încărcată pozitiv). În medie, un electron primește de la o particulă α o energie de 100—200 eV, suficientă ca acest electron, la rîndul lui, să dea ionizări secundare *,

* În realitate, 70—80% din ionizări sînt secundare.

întrucît pentru crearea unei perechi de ioni se consumă în medie o energie de $W = 35$ eV (în aer, $W = 33{,}7$ eV). Această valoare nu reprezintă de fapt energia de ionizare, care este mult mai mică, ci include și energia cheltuită pentru excitări electronice și vibraționale. S-a calculat că pentru fiecare pereche de ioni creată se excită electronic 2,2 molecule, cu o energie care este luată în considerare în cifrele de mai sus.

Cum o particulă grea pierde la fiecare ciocnire o energie mică în raport cu energia ei totală, parcursul ei este drept, fără devieri de la liniaritate, așa cum se vede din clișeele efectuate în camera cu ceață sau camera Wilson. Numărul de perechi de ioni produși pe unitatea de lungime se numește ionizarea specifică (IS), iar energia medie pierdută pe unitatea de lungime a traiectoriei se numește transferul liniar de energie (TLE). Există relația aproximativă

$$\text{TLE} = W \times \text{IS}. \tag{1.4}$$

Pentru particule α, ionizarea specifică crește lent de-a lungul traiectoriei: în aer, plecînd de la IS = 2000 per/mm valoarea crește pînă la o distanță de circa 3 mm de la sfîrșitul traiectoriei unde IS atinge maximul $\text{IS} = 7000 \frac{\text{perechi}}{\text{mm}}$ după care scade rapid (fig. 1.13). Din relația (1.4) rezultă, pentru o valoare IS medie pe toată traiectoria de $\frac{3000 \text{ perechi de ioni}}{\text{mm}}$, $\text{TLE} = 33{,}7 \times 3000$ eV/mm $\cong 0{,}1$ MeV/mm. Se vede că o particulă α de $E = 6$ MeV va străbate circa $\frac{6 \text{ MeV}}{0{,}1 \frac{\text{MeV}}{\text{mm}}} = 6$ cm de aer la presiunea normală:

$$\text{Parcursul } R = \frac{E}{\text{TLE}}. \tag{1.5}$$

De-a lungul acestui parcurs, au fost create 180000 perechi de ioni. Relația (1.5) arată că există o relație liniară între parcurs și energia particulei α. Dat fiind că particulele discutate au toate aceeași energie, parcursurile lor R vor fi egale.

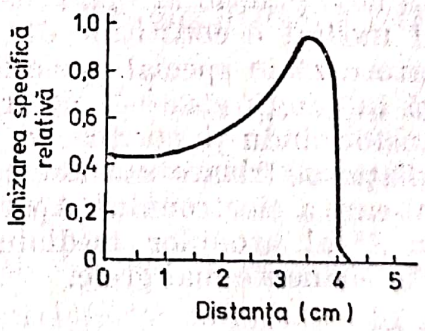


Fig. 1.13. — Ionizarea specifică și numărul de particule la trecerea prin materie a unui flux colimat de particule α.

Particulele mai ușoare (protoni, deuteroni) vor avea parcursuri corespunzător mai lungi.

Parcursul se exprimă, pentru un mediu dat, în unități de lungime. În medii lichide sau gazoase, cu densități de materie de $\sim 10^3$ ori mai mari decît aerul, parcursul va fi corespunzător mai mic, de ex. o particulă α de 5 MeV va străbate în apă sau în țesut animal o distanță de 32,5 μm,

iar protonii de aceeaşi energie au parcursul 355 μm în apă. Dat fiind că W nu depinde mult de natura (adică de Z şi de densitatea) mediului, se poate exprima parcursul pentru orice mediu în alte unităţi care iau în considerare densitatea de materie, şi anume în mg/cm²*. Există relaţii care permit calcularea parcursului în orice mediu, în funcţie de energia şi natura particulei grele încărcate, şi de numerele de ordine ale elementelor care intră în compoziţia mediului. Natura legăturilor chimice dintre aceşti constituenţi nu modifică sesizabil parcursul.

Rezultă că particulele grele încărcate sînt nepericuloase la iradierea externă, radiaţiile fiind reţinute de o foiţă de hîrtie sau de un strat nu prea gros de aer. În organism însă nuclizii α-activi sînt extrem de periculoşi din cauza ionizării specifice foarte mari. Fasciculele de energii mai mari, produse de ciclotron sau de un accelerator liniar Van de Graaff au puteri de pătrundere mai mari şi de aceea sînt periculoase chiar la iradiere externă.

1.3.2. INTERACŢII CU ELECTRONI ŞI POZITRONI (A.2)

Electronii, produşi fie în betatroane, fie ca radiaţii β^- de către nuclizii β-activi, fie ca electroni de conversie internă, se comportă în unele privinţe similar cu particulele grele discutate mai sus: W este acelaşi ca mai înainte, iar procentul de ionizări secundare faţă de cele primare este asemănător. Există însă şi diferenţe marcate provenite din masa mult mai mică a electronilor. La energii de ordinul unui MeV, viteza electronilor este de cîteva zeci de ori mai mare decît a particulelor grele, fiind 94% din viteza luminii în vid. La aceste viteze, ionizarea specifică este mult mai mică, fiind în aer de 5—50 perechi de ioni/mm, de 100 de ori mai redusă decît pentru particulele α. Masa mai mică permite electronului să piardă o fracţiune importantă din energia sa într-o ciocnire cu un electron sau un nucleu din mediu, electronul iniţial fiind deflectat elastic sau neelastic la un unghi diferit de direcţia iniţială (împrăştiere). Acest unghi de împrăştiere poate fi, în cazul ciocnirilor elastice cu nuclee, foarte mare, pînă la 180° (retroîmprăştiere), electronii fiind împrăştiaţi în direcţia de sosire.

Cînd mediul este format din elemente cu Z mic, împrăştierea elastică a electronilor se face practic în egală măsură de către electroni şi de către nuclee; cînd mediul e constituit din elemente mai grele, împrăştierea elastică se datorează în special nucleelor.

Pe lîngă interacţii elastice, electronii dau şi interacţii neelastice cu nucleele, transformîndu-şi energia în fotoni (radiaţie electromagnetică, denumită radiaţie de frînare sau Bremsstrahlung), emişi perpendicular pe direcţia de mişcare a electronului. Apariţia radiaţiei de frînare este proporţională cu Z^2 al atomilor mediului, de aceea este apreciabilă cînd mediul conţine elemente mai grele.

---

* Pentru calculul în aceste unităţi se foloseşte una din relaţiile:

$$\frac{\text{mg}}{\text{cm}^2} = \text{grosimea absorbantului (cm)} \times \text{densitatea lui} \left(\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}\right);$$

$$\frac{\text{mg}}{\text{cm}^2} = \text{masa absorbantului (mg)/secţiunea lui (cm}^2\text{)}.$$

Scanned with OKEN Scanner

Toate acestea împreună cu faptul că radiaţiile beta nu sînt monoenergetice, fac ca atenuarea fasciculului de electroni să nu fie bruscă, ca în cazul particulelor încărcate grele, ci oarecum exponenţială, existînd însă un parcurs maxim. În figura 1.14 se prezintă atenuarea unui fascicul de radiaţii β în aluminiu. Faptul că activitatea nu se reduce la zero la grosimi mari se datorează radiaţiei de frînare; dacă se scade aceasta, se obţine

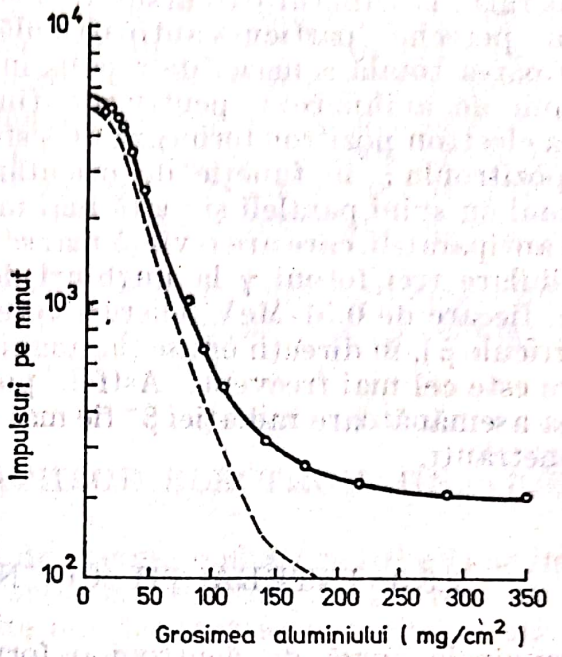


Fig. 1.14. — Activitatea unui flux colimat de radiaţii β la trecerea prin aluminiu.

curba punctată. Există mai multe procedee pentru a obţine parcursul radiaţiilor β din curbele de tipul celor arătate, de ex. metoda Feather [65]. Măsurarea parcursului dă posibilitatea calculării energiei maxime a radiaţiilor β, de ex. după relaţia :

$$R = 0{,}543\ E_{max} - 0{,}160$$

(R, în g/cm^2 de aluminiu, E_{max} în MeV, valabilă pentru 0,6 MeV $< E_{max} <$ < 15 MeV). Procedeul implică intercalarea unui număr de folii de aluminiu între sursa de radiaţii β şi contor. Actualmente, spectrometrele β permit mai exact determinarea E_{max} dar sînt mai costisitoare. După cum se ştie, alături de $T_{1/2}$, energia radiaţiilor este o caracteristică importantă pentru identificarea unui radionuclid.

Se mai utilizează valori $D_{1/2}\left(\frac{mg}{cm^2}\right)$ ale grosimii de absorbant necesar pentru a reduce la jumătate numărul electronilor (a se vedea mai departe la radiaţii γ); există relaţia empirică :

$$D_{1/2} = 41\ (E_{max})^{1{,}14} \text{ pentru } 0{,}1 \text{ MeV} < E_{max} < 4 \text{ MeV}.$$

Parcursul radiaţiei β moi emisă de ^{35}S ($E_{max} = 0{,}167$ MeV), în aer, este de 28 cm, iar în aluminiu de 0,1 mm; radiaţia β dură emisă de ^{89}Sr ($E_{max} = 1{,}5$ MeV) are un parcurs de 5,1 m în aer şi de 2,47 mm în aluminiu, deci în acest caz parcursul exprimat în $\frac{mg}{cm^2}$ este de 0,247 cm $\times$ $\times\ 2700\ \frac{mg}{cm^3} = 667\ \frac{mg}{cm^2}$.

Scanned with OKEN Scanner

Spre deosebire de traiectoriile rectilinii ale particulelor α, radiația β arată în camera Wilson traiectorii întortochiate.

Pozitronii (radiațiile β^+) se comportă, la energii de ordinul MeV sau keV, similar cu electronii (radiațiile β^-) : au ionizări specifice și parcursuri similare (la pozitroni de energie egală, parcursul este cu cîteva procente mai lung). Diferența esențială apare după ce pozitronul și-a pierdut aproape toată energia ; la capătul parcursului, el se combină cu un electron dînd, ca orice pereche particulă-antiparticulă, o reacție de anihilare cu transformarea totală a masei de repaus în energie de cîmp electromagnetic (fotoni de anihilare) : pentru un timp foarte scurt (10^{-6}—10^{-7} s), perechea electron-pozitron formează un sistem analog atomului de hidrogen, numit pozitroniu ; în funcție de orientările spinilor se deosebesc orto-pozitroniul cu spini paraleli și viață mai mare, (10^{-6} s) și para-pozitroniul, cu spini antiparaleli, care are o viață mai scurtă (10^{-9} s). orto-Pozitroniul dă prin anihilare trei fotoni γ la unghiuri de 120°, para-pozitroniul dă doi fotoni γ, fiecare de 0,51 MeV (energia corespunzătoare masei de repaus a unei particule β), în direcții opuse (la unghiuri de 180°). Acest ultim mod de anihilare este cel mai frecvent. Astfel, pozitronii pot fi detectați fie prin ionizarea asemănătoare radiației β^- fie mai adesea prin fotonii de anihilare, mai penetranți.

1.3.3. INTERACȚII CU NEUTRONI (A.3)

Principala sursă de neutroni o formează reactoarele nucleare. În interiorul zonei active ele furnizează neutroni rapizi ; în coloana termică sau în canalele termice ele furnizează neutroni termici, folosiți în producția de radioizotopi, în iradierea probelor chimice sau biologice, și în analiza prin radioactivare. Există și surse portabile de neutroni : generatorii de neutroni, în care se bombardează ținte de tritiu cu deuteroni accelerați de o diferență de potențial de 150 kV, dau neutroni rapizi de 14,1 MeV ; californiul-252 ($T_{1/2}$ = 2,65 a) dă fisiune spontană și în cantități de ng-μg (masa lui critică fiind de ordinul gramelor) dă surse punctuale convenabile, deși relativ scumpe ; mai ieftine sînt sursele de neutroni formate dintr-un amestec de radionuclid natural emițător α și beriliu folosind reacția $^{9}Be(\alpha, n)^{12}C$: cele mai folosite sînt ^{210}Po—Be ($T_{1/2}$ doar de 138 zile), ^{226}Ra—Be (are pe lîngă neutroni un fond ridicat de radiații γ, dar viață practic nelimitată) și ^{239}Pu—Be (are viață și mai lungă, fără fond γ, dar activitate specifică mai redusă) ; energia neutronilor este de pînă la 13 MeV. Există și surse de tip (γ, n), de ex. ^{124}Sb—Be (20 keV) ; ^{24}Na—D_2O (200 keV) și ^{140}La—Be (600 keV), dar ele dau un fond γ apreciabil ; în schimb neutronii sînt monoenergetici cu energiile înscrise în paranteze după fiecare sursă ; se vede că energiile sînt mult mai mici decît la sursele de tip (α, n) ; reacțiile care au loc sînt $^{9}Be(\gamma, n)\,^{8}Be$; $^{8}_{4}Be \rightarrow 2\ ^{4}_{2}He$ și $^{2}H\,(\gamma, n)\,^{1}H$.

Neutronii rapizi interacționează elastic cu nucleele : transferul de energie este maxim cînd masa nucleului este egală cu a neutronului, adică la hidrogen, și scade cînd nucleele sînt mai grele. De aceea ca moderatori în reactoarele nucleare se folosesc H_2O, D_2O sau grafitul. Pentru ecranarea surselor de neutroni se folosesc materiale bogate în hidrogen (parafină, polietenă) pentru a termaliza neutronii rapizi și elemente cu secțiune mare de captură pentru neutroni (^{10}B, secțiune 3832 barni) de ex. sub formă de amestec parafină + acid boric. În țesutul viu, ciocnirile elastice

dintre neutroni şi atomii de hidrogen constituie peste 90% din transferul de energie de la fascicule de neutroni cu energii pînă la 10 MeV. Atomii de hidrogen ciocniţi sînt smulşi sub formă de protoni de recul din combinaţiile chimice în care existau, iar aceşti protoni dau ionizări şi excitări conform celor discutate anterior.

Între 10 şi 30% din energia neutronilor rapizi disipată în ţesuturile vii este cheltuită în ciocniri neelastice (captură, însoţită de emisie γ, emisie de 1—2 neutroni, emisie de particule încărcate, p, d, sau α).

Neutronii lenţi interacţionează în special prin captură radiativă (n, γ), ducînd la apariţia de cuante γ (vezi mai departe). Probabilitatea acestei capturi este invers proporţională cu viteza neutronilor, dar cînd energia neutronilor este egală cu diferenţa între două nivele energetice nucleare, probabilitatea de captură creşte, rezultînd o absorbţie de rezonanţă; rezultatul este acelaşi, dezexcitarea nucleului ducînd tot la un foton γ.

Se vede din cele de mai sus că neutronii interacţionează cu materia exclusiv prin ionizări secundare, pe seama protonilor (şi celorlalte nuclee) de recul, şi a fotonilor gamma formaţi primar.

1.3.4. INTERACŢIA RADIAŢIILOR ELECTROMAGNETICE (B.1)

După originea lor, fotonii de energie înaltă ($>10^2$ eV) se împart în radiaţii X, provenite din interacţia fasciculelor de electroni cu nucleele unei ţinte, şi radiaţii γ, provenite din dezintegrarea nuclizilor radioactivi. Radiaţia de frînare, amintită la radiaţiile β, şi fotonii produşi la betatron, ar trebui clasificaţi ca radiaţii X. În realitate, neexistînd nici o diferenţă între natura acestor radiaţii, împărţirea este absolut convenţională; se obişnuieşte ca fotonii de energie între 0,1—100 keV produşi în instalaţii Roentgen să fie denumiţi radiaţii X, iar fotonii de $10—10^4$ keV, proveniţi din procese radioactive sau la betatron, să fie denumiţi radiaţii γ.

Ionizarea specifică a fotonilor este de cîteva zeci sau sute de ori mai redusă decît a electronilor de energie egală, de aceea penetraţia fotonilor este mult mai pronunţată. Atenuarea este strict exponenţială şi ca atare, în mod riguros, nu se poate vorbi de un parcurs al radiaţiilor γ, intensitatea lor nescăzînd la zero decît la o grosime infinită de absorbant; în practică însă, se poate fixa un prag sub care nu se mai pot decela cuante γ, astfel că parcursul practic al radiaţiilor γ este în adevăr mult mai mare decît al electronilor, care la rîndul lor era mult mai mare decît al particulelor α. Şi la radiaţiile γ, ca şi la neutroni, ionizarea este în întregime de natură secundară şi provine în principal din trei efecte care vor fi discutate separat [66, 67].

B.1.1. *Efectul fotoelectric* predomină la energii joase ale fotonilor (şi rămîne efect predominant într-un domeniu mare al acestor energii), la interacţia cu medii conţinînd nuclee grele, cu Z mare : energia $h\nu$ a fotonului se transferă *în totalitate* unui electron legat din mediul străbătut; fotonul dispare, iar electronul este expulzat cu o energie cinetică $E_c = h\nu - E_l$, unde E_l este energia de legătură a electronului din atom (fig. 1.15). Efectul fotoelectric apare chiar la energiile mici ale radiaţiilor infraroşii, vizibile sau ultraviolete; energia mică a fotonului smulge electroni din păturile de valenţă ale atomilor, depărtate de nucleu. În cazul fotonilor γ, posedînd energii mult mai mari, sînt expulzaţi electroni din păturile

Scanned with OKEN Scanner

interioare K şi L, învecinate nucleului. La energii egale sau mai mari cu energia de legătură în pătura K a absorbantului, absorbţia fotoelectrică se produce în majoritate (peste 80%) în pătura K; cînd energia fotonului scade sub această valoare a energiei de legătură, apare o discontinuitate în probabilitatea absorbţiei, care nu mai poate avea loc decît în pătura L,

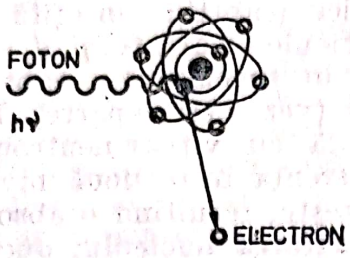


Fig. 1.15. — Efect fotoelectric cu un electron din pătura K a oxigenului.

cum se vede din figura 1.16 pentru cazul cînd absorbantul este plumbul; în apă, discontinuităţile apar la energii $h\nu$ mai mici, care ies din cadrul figurii.

Electronul expulzat (fotoelectronul) are o direcţie aproximativ perpendiculară pe direcţia fotonului la energii mici; la energii mai mari, unghiul se micşorează puţin. În locul vacant de pe pătura K sau L a atomului vor intra electroni de pe păturile mai îndepărtate, ducînd la apariţia radiaţiilor X caracteristice absorbantului; apar şi electroni Auger. Atît fotoelectronul cît şi electronii Auger dau apoi ionizări secundare.

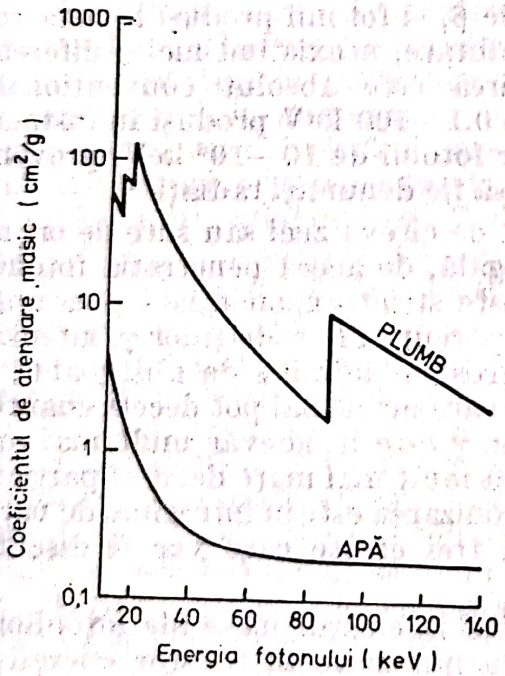


Fig. 1.16. — Coeficienţii de atenuare masică prin efect fotoelectric ai radiaţiilor X sau γ de diferite energii, în apă sau în ţesuturi moi, ori în plumb.

Probabilitatea apariţiei efectului fotoelectric depinde de energia fotonului fiind proporţională cu $(h\nu)^{-3}$, (ea devine neglijabilă la energii peste 1 MeV) şi de numărul atomic al absorbantului, crescînd cu Z^3. Această puternică dependenţă de Z este cauza principală pentru care se folosesc materiale cu Z mare (în special plumbul) pentru ecranare şi radioprotecţie. În ţesături vii, efectul fotoelectric este cel dominant la energii $h\nu$ sub 35 keV, cum reiese din tabela 1.4.

Scanned with OKEN Scanner

B.1.2. *Efectul Compton* predomină la energii intermediare ale fotonilor γ, în jur de 1 MeV, și rămîne efect predominant într-un domeniu mare al acestor energii la interacția cu medii conținînd atomi ușori : energia $h\nu$ a fotonului se transferă *parțial* unui electron liber, sau slab legat, din mediul străbătut ; fotonul este împrăștiat sub un unghi φ (0—180°) și

TABELA 1.4

Interacția în țesutul viu a fotonilor X sau γ emiși de cîțiva radionuclizi utilizați în biologie și medicină [66]

Radionuclid	Foton		Interacția în mediu apos	
	$h\nu$ (keV)	λ(Å)	Efect fotoelectric	Efect Compton
^{125}I	28,61	0,433	65 %	35 %
^{125}I	35,48	0,349	48 %	52 %
^{197}Hg	77,34	0,160	18 %	72 %
^{99m}Tc	142,70	0,869	1 %	99 %
^{113m}In	391,69	0,032	0,1 %	99,9 %

rămîne cu energie redusă, iar electronul este proiectat cu un unghi θ (0—90°) față de direcția inițială a fotonului (fig. 1.17) primind o energie cinetică $E_c = h\nu - h\nu'$.*

Lungimea de undă a fotonului împrăștiat după interacție este

$$\lambda'(\text{Å}) = \frac{c}{\nu'} = \frac{c}{\nu} + 0{,}0243(1 - \cos\varphi),$$

iar energia fotonului după interacție este

$$h\nu'(\text{keV}) = \frac{12{,}4}{\lambda'(\text{Å})}.$$

Din formulele de mai sus se vede că pierderea de energie maximă are loc cînd unghiul de împrăștiere al fotonului este 180° ($\cos\varphi = -1$) ; în acest caz, lungimea de undă crește cu $2 \times 0{,}0243 = 0{,}049$ Å. La energii mici

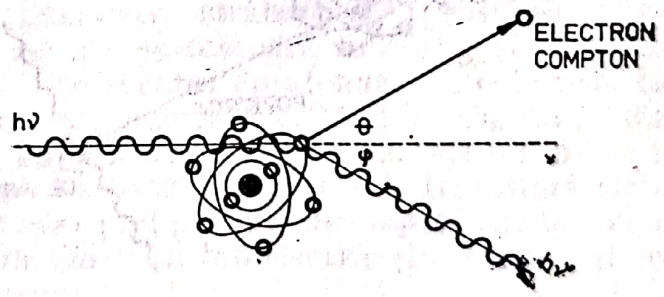


Fig. 1.17. — Efect Compton cu un electron de valență al oxigenului.

ale fotonilor γ, de ordinul zecilor și sutelor de keV, lungimile lor de undă sînt de ordinul 1—0,1 Å, iar mărirea lungimii de undă este neglijabilă ; deci energia pierdută de foton și transferată electronului Compton este redusă. La energii ale fotonilor γ de ordinul unui MeV, lungimea de undă

* Fotonul rămîne după interacție cu frecvența ν' și lungimea de undă λ'.

este de ordinul 0,01 Å, deci mărirea lungimii de undă este apreciabilă, majoritatea energiei fotonului transferîndu-se electronului Compton : indiferent de cît de mare era energia lui inițială, un foton împrăștiat sub un unghi $\varphi = 180°$ nu poate reține mai mult de 0,256 MeV, iar la un unghi $\varphi = 90°$ el nu poate reține mai mult de 0,51 MeV.

Natura mediului absorbant (variația numărului atomic Z) are o influență redusă asupra efectului Compton, contînd doar densitatea electronilor din mediu.

Probabilitatea împrăștierii Compton este proporțională cu $(h\nu)^{-1}$ deci scade și ea cu creșterea energiei fotonilor, dar mai încet decît probabilitatea efectului fotoelectric. Efectul Compton este predominant la elementele ușoare sau la interacția cu țesuturile vii în intervalul 0,1 MeV $< h\nu <$ 10 MeV, dar la plumb el predomină în intervalul mai restrîns 0,6 MeV $<$ $< h\nu <$ 4 MeV.

B.1.3. *Formarea de perechi electron-pozitron* predomină la energii mari ale fotonilor, de peste 5—10 MeV și rămîne efect predominant într-un domeniu mare al acestor energii la interacția cu medii conținînd nuclee grele : dacă fotonul γ are o energie de cel puțin 1,02 MeV $= 2\, m_e c^2$, unde m_e este masa de repaus a electronului sau pozitronului, atunci în imediata apropiere a unui nucleu (care primește o fracțiune neglijabilă din energia și impulsul fotonului) (vezi fig. 1.18) se produce „materializarea" fotonului : acesta dispare, energia cîmpului electromagnetic $h\nu$ transformîndu-se într-o pereche pozitron + electron care primesc împreună (cu orice repartizare a acestei energii) o energie cinetică de $(h\nu - 1{,}02)$ MeV. Cînd $h\nu \geqslant 2{,}04$ MeV, materializarea se mai poate produce și în apropierea unui electron, care primește o fracțiune apreciabilă din energia fotonului, ducînd la producerea unui „triplet" : doi electroni și un pozitron. Producerea tripleților crește în defavoarea producerii de perechi la energii mari ale fotonilor și la Z mic al mediului străbătut. Global, probabilitatea formării de perechi și tripleți pozitron-electron crește cu creșterea numărului atomic Z al mediului și cu energia fotonilor. În țesuturi biologice, la $h\nu < 10$ MeV, formarea de perechi are o contribuție redusă.

Odată formată, perechea $e^+ + e^-$ dă ionizări secundare, iar la sfîrșitul parcursului, pozitronul dă cei doi fotoni de anihilare de 0,51 MeV.

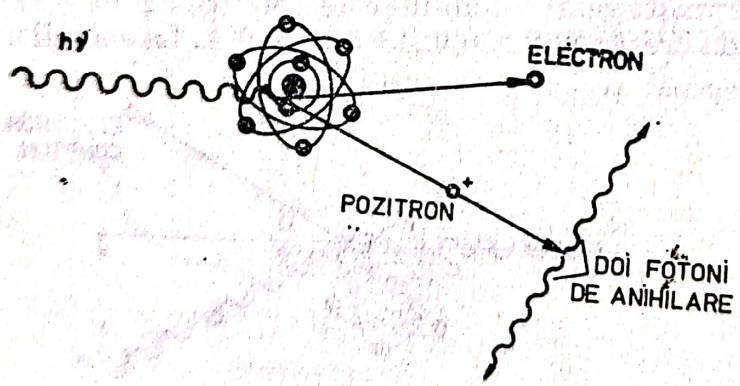


Fig. 1.18. — Formarea de perechi electron-pozitron în apropierea unui nucleu de oxigen, urmată de anihilarea pozitronului.

Toate cele trei efecte discutate pînă acum sînt ilustrate împreună în figura 1.19, în funcție de energia fotonului incident (în abscisă) și de numărul atomic (sau Z mediu) al mediului absorbant. Cele trei regiuni arată care efect este predominant.

Mai există alte două feluri de interacții ale fotonilor cu materia, anume difuzia coerentă (difuzia Rayleigh) care nu produce ionizări secundare, și fotodezintegrarea, adică reacții nucleare provocate de fotoni.

Scanned with OKEN Scanner

Acestea din urmă au loc doar la energii $h\nu > 8$ MeV; o excepție este reacția (γ, n) care are loc la energii mai mici, de ex.

$^{9}Be(\gamma, n)\,^{8}Be$, energie minimă $h\nu \geq 1{,}65$ MeV

$^{2}H(\gamma, n)\,^{1}H$, energie minimă $h\nu \geq 2{,}22$ MeV.

Aceste două reacții sînt folosite în sursele de neutroni descrise mai înainte (§ 1.3.3).

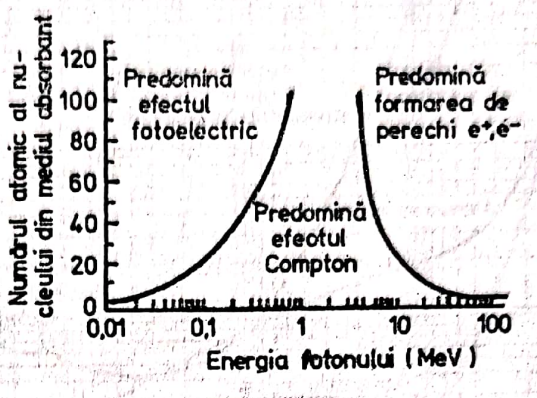


Fig. 1.19. — Importanța relativă a efectelor fotoelectric și Compton și a formării de perechi electron-pozitron, în funcție de numărul atomic Z al nucleelor mediului străbătut de fotonii X sau γ, avînd diferite energii $h\nu$.

La traversarea unui absorbant, intensitatea I a unui fascicul de fotoni X sau γ monocromatic (cu toți fotonii avînd aceeași energie) scade exponențial după o lege de tip:

$$I = I_0\, e^{-\mu x} \text{ sau } \ln (I_0/I) = \mu x, \qquad (1.6)$$

unde I_0 este intensitatea la intrarea în absorbant, x grosimea absorbantului, iar μ coeficientul de atenuare; dacă x este măsurat în m, μ se măsoară în m^{-1} și se numește coeficient liniar de atenuare; el variază direct proporțional cu densitatea ρ a materiei traversate, de aceea uneori se preferă un coeficient care să nu depindă de densitate; pentru aceasta se folosește legea

$$I = I_0 e^{-\frac{\mu}{\rho}\rho x},$$

unde produsul densității cu grosimea străbătută, „grosimea masică" (ρx) este măsurat în g/cm^2, iar μ/ρ se măsoară în cm^2/g și se numește coeficient de atenuare masică. Coeficientul de atenuare μ este rezultanta tuturor celor trei efecte descrise mai înainte (1A, 2A, 1B). Figura 1.20 redă coeficientul total de atenuare masică, în funcție de energia fotonilor, pentru următoarele medii: aer, apă sau țesut viu, și plumb. La ultima curbă se observă un minim în jur de 3 MeV; el provine din faptul că, la creșterea energiei $h\nu$, scad probabilitățile efectului fotoelectric și Compton și crește probabilitatea formării de perechi.

Grosimea (liniară sau masică) de absorbant necesară pentru a reduce la jumătate intensitatea unui fascicul monocromatic de fotoni se numește „grosimea stratului de înjumătățire" și este notată cu D; ea se poate calcula din relația

$$\frac{I_0}{2} = I_0\, e^{-\mu D}, \quad D = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0{,}697}{\mu} \cong \frac{0{,}7}{\mu}. \qquad (1.7)$$

Cunoscînd această relaţie între μ şi D, şi obţinînd din tabele sau diagrame valoarea μ pentru energia fotonului şi mediul absorbant din cazul concret care interesează, se poate calcula uşor numărul n de grosimi pentru a reduce intensitatea la valoarea dorită I :

$$\frac{I_0}{I} = 2^n. \tag{1.8}$$

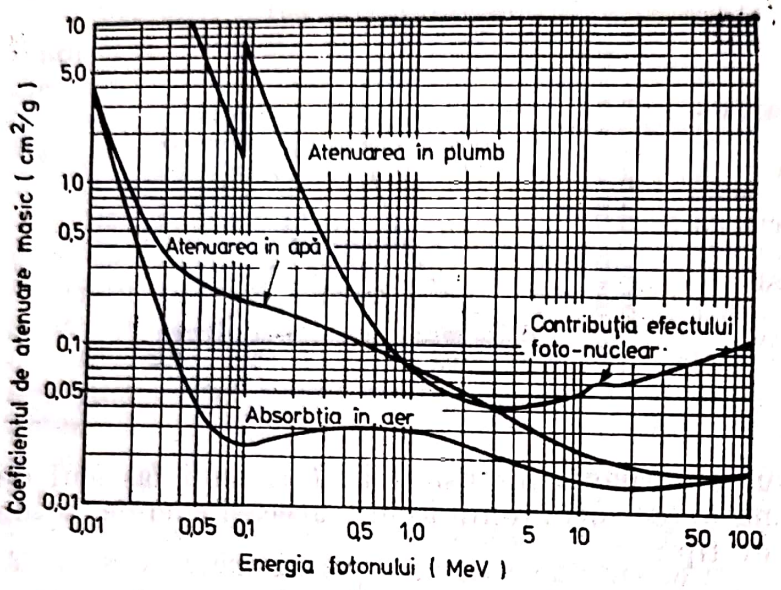


Fig. 1.20. — Coeficienţii totali de atenuare masică pentru fotoni X sau γ de diferite energii, în apă sau în ţesuturi moi, ori în plumb.

Deoarece plumbul are transparenţa maximă pentru fotoni cu energie de circa 3 MeV, o aceeaşi valoare a grosimii stratului de înjumătăţire D de ex. 15,5 $\frac{g}{cm^2}$ corespunde atît energiei de 2,0 MeV cît şi 5,9 MeV (fig.1.21).

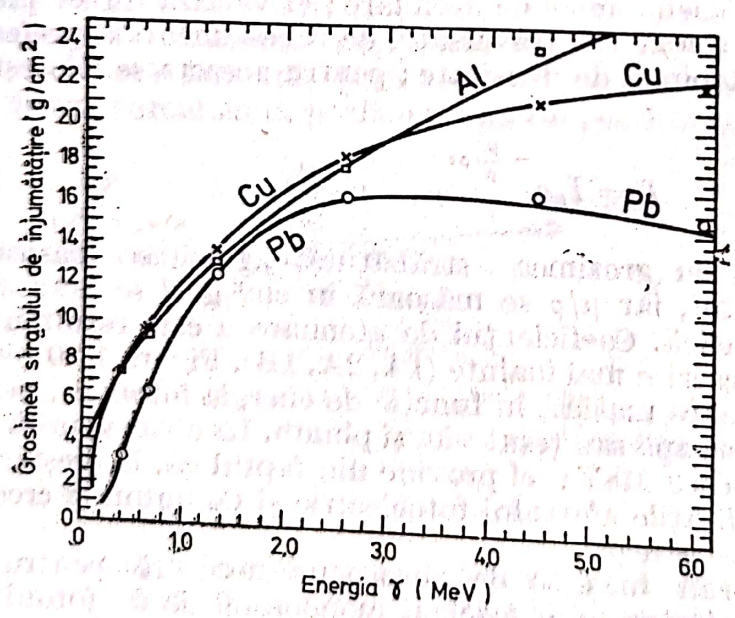


Fig. 1.21. — Grosimea stratului de înjumătăţire în diferite materiale, pentru radiaţii γ de diverse energii.

Grosimile stratului de înjumătăţire, D, măsurate experimental prin intercalarea treptată a unor foi de absorbant între sursa de fotoni şi numărător, pot servi pentru determinarea energiei fotonilor. Din cauza ambiguităţii menţionate, trebuie însă efectuate două determinări cu doi absorbanţi diferiţi.

Calculul ecranării pentru radioprotecţie se poate efectua fie cu formula (1.6), fie folosind valorile D din formulele (1.7) şi (1.8).

De exemplu, dacă intensitatea unui fascicul îngust şi monoenergetic de fotoni γ este redusă la jumătate de o folie de aluminiu groasă de 2 mm, să se calculeze μ şi grosimea de aluminiu necesară pentru a reduce intensitatea fasciculului la o optime. Soluţia după formula (1.6): $\ln 2 = \mu \times 2$ mm, $\mu = 0{,}7/2 = 0{,}35$ mm^{-1}; apoi, după aceeaşi formulă (1.6), $\ln 8 = 0{,}35\,x$, $x = \dfrac{\ln 8}{0{,}35} = 6$ mm; mai simplu, dat fiind că $1/8 = (1/2)^3$, rezultă că grosimea cerută este egală cu $3D = 3 \times 2$ mm $= 6$ mm.

În cazul radionuclizilor care emit mai mulţi fotoni γ cu energii diferite, sau în cazul fasciculelor largi, necolimate, de fotoni, calculul este mai complex [64].

1.4. DOZIMETRIA RADIAŢIILOR [43, 64, 66—76]

Efectele pe care le exercită iradierea cu radiaţii ionizante depind de mai mulţi factori. Unii din aceşti factori sînt legaţi de (1) sursa de iradiere (activitatea sursei, natura radiaţiilor), alţii de (2) geometria iradierii (distanţa dintre sursă şi mediu, unghiul solid, colimarea fasciculului) şi, în fine, alţi factori sînt legaţi de (3) mediul iradiat (puterea mediului de a frîna radiaţiile, sensibilitatea diferită faţă de anumite radiaţii). Pentru a putea separa esenţialul de neesenţial, dat fiind că unii din factorii de mai sus se influenţează reciproc, s-a convenit [77] ca efectele radiaţiilor să fie măsurate după cum urmează.

1.4.1. EXPUNEREA LA RADIAŢII

Expunerea caracterizează sursa şi geometria iradierii, însă numai pentru surse de fotoni (radiaţii X sau γ) de energie pînă la 3 MeV. Pentru măsurarea expunerii la radiaţii se foloseşte un mediu standard, aerul la presiunea normală. Radiaţiile produc perechi de ioni într-o cameră de ionizare * umplută cu m grame aer, iar sarcinile Q colectate definesc expunerea X la radiaţii

$$X = \frac{Q}{m}.$$

Unitatea de măsură pentru expunerea la radiaţii se numeşte roentgen (R); iniţial, această unitate s-a definit ca fiind acea expunere care produce, într-un cm^3 de aer în condiţii normale de temperatură şi presiune (1 ml aer cîntăreşte în aceste condiţii 1,293 mg), ioni totalizînd o unitate electrostatică de sarcini de fiecare semn (1 u.e.s. CGS = 1 franklin, Fr). În sistemul internaţional de unităţi (SI) care utilizează coulombi (C) şi kg, factorul de conversie se calculează astfel:

$$1\,\mathrm{R} = \frac{1\,\mathrm{Fr}}{1\,\mathrm{cm^3\ aer}} \cdot \frac{1}{3\cdot 10^9 \dfrac{\mathrm{Fr}}{\mathrm{C}}} \cdot \frac{1}{1{,}293\cdot 10^{-6} \dfrac{\mathrm{kg\ aer}}{\mathrm{cm^3\ aer}}} = 2{,}58\cdot 10^{-4} \frac{\mathrm{C}}{\mathrm{kg\ aer}}.$$

* De tip special cu pereţi de bachelită cum este cea comercializată de firma „Victoreen".

Pentru o expunere la radiații (X, în roentgeni) se pot calcula: energia absorbită, precum și numărul perechilor de ioni produse în unitatea de masă de aer. Știind că sînt necesari 33,7 eV pentru producerea unei perechi de ioni (prescurtată per.), și că sarcina elementară este $4{,}8 \cdot 10^{-10}$ Fr/per., rezultă că:

$$X(\mathrm{R}) = X \frac{\mathrm{Fr}}{\mathrm{cm^3\ aer}} \cdot \frac{1}{4{,}8 \cdot 10^{-10} \frac{\mathrm{Fr}}{\mathrm{per.}}} = 2{,}083 \cdot 10^9\, X \frac{\mathrm{per.}}{\mathrm{cm^3\ aer}},$$

$$X(\mathrm{R}) = 2{,}083 \cdot 10^9\, X \frac{\mathrm{per.}}{\mathrm{cm^3\ aer}} \cdot \frac{1}{1{,}293 \cdot 10^{-6} \frac{\mathrm{kg\ aer}}{\mathrm{cm^3\ aer}}} = 1{,}61 \cdot 10^{15}\, X \frac{\mathrm{per.}}{\mathrm{kg\ aer}},$$

$$X(\mathrm{R}) = 1{,}61 \cdot 10^{15}\, X \frac{\mathrm{per.}}{\mathrm{kg\ aer}} \cdot 33{,}7 \frac{\mathrm{eV}}{\mathrm{per.}} \cdot 1{,}6 \cdot 10^{-19} \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{eV}}$$

$$= 86{,}9 \cdot 10^{-4}\, X \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{kg\ aer}} = 86{,}9\, X \frac{\mathrm{erg}}{\mathrm{g\ aer}}$$

Expunerea-debit este raportul între expunere și timp.

1.4.2. DOZA ABSORBITĂ

Această doză caracterizează toți trei factorii: sursa de radiații, geometria iradierii și mediul absorbant. Plecînd de la observația că o expunere de un roentgen depozitează în aer o energie de aproape 100 erg/g, se definește unitatea de doză absorbită (pentru orice fel de radiații și orice fel de mediu) ca fiind un rad *:

$$1\ \mathrm{rad} = 100 \frac{\mathrm{erg}}{\mathrm{gram}} = 100 \frac{\mathrm{erg}}{\mathrm{g}} \cdot 10^{-7} \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{erg}} \cdot {}^{3} \frac{\mathrm{g}}{\mathrm{kg}} = 0{,}01 \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{kg}}.$$

Numele unității provine de la inițialele engleze (*R*adiation *A*bsorbed *D*ose), iar pentru o energie oarecare E și o masă oarecare m a mediului, doza D (în rad) este:

$$D = \frac{E(\mathrm{J})}{m(\mathrm{kg})} \cdot \frac{1}{0{,}01 \left(\frac{\mathrm{J}}{\mathrm{kg.\ rad}} \right)}.$$

Dacă mediul absorbant este aerul, iar sursa emite fotoni X sau γ de energie sub 3 MeV, doza absorbită la o expunere de X roentgeni este de

$$D_{\mathrm{aer}} = 86{,}9 \cdot 10^{-4}\, X \left(\frac{\mathrm{J}}{\mathrm{kg}} \right) \cdot \frac{1}{0{,}01 \left(\frac{\mathrm{J}}{\mathrm{kg.\ rad}} \right)} = 0{,}869\, X\ (\mathrm{rad}).$$

* Pentru a evita confuzia cu prescurtarea unității de unghi (radian) în sistemul SI s-a aprobat [76a—76c] folosirea unității *gray* (Gy): 1 Gy = 1 J/kg = 100 rad. De asemenea, se preconizează abandonarea „expunerii la radiații" discutată în paragraful precedent.

Pentru un mediu absorbant oarecare (y) iradiat cu fotoni de energie sub 3 MeV se poate ca măsurînd expunerea (cu o cameră mică de ionizare umplută cu aer în interiorul mediului) să se calculeze doza absorbită dacă se cunosc coeficienţii medii de absorbţie μ_{aer} şi μ_y pentru fotonii respectivi :

$$D_y = D_{aer}\frac{\mu_y}{\mu_{aer}} = 0{,}869\ X\frac{\mu_y}{\mu_{aer}} = fX,$$

unde $f = 0{,}869\frac{\mu_y}{\mu_{aer}}$ se numeşte factorul f al radiaţiei fotonice (X sau γ de energie sub 3 MeV). Figura 1.22 prezintă valori ale factorului f în funcţie de grosimea stratului de înjumătăţire pentru muşchi sau ţesut moale, şi pentru oase, care permite calcularea dozei absorbite (în rad) măsurînd expunerea (în R).

Pentru un mediu absorbant oarecare iradiat cu fotoni de energie peste 3 MeV, sau cu alte feluri de radiaţii ionizante (electroni, pozitroni, neutroni etc.), nu se mai poate face o corespondenţă între expunerea la radiaţii (măsurabilă cu camera de ionizare) şi doza absorbită. Se disting două feluri de radiaţii ionizante, cele care ionizează direct (electroni, pozitroni) şi cele care ionizează indirect (fotoni, neutroni). Absorbţia primului fel de radiaţii se caracterizează prin *energia specifică cedată* de perechile de ioni produse prin ionizare directă, iar al celui de-al doilea fel de radiaţii prin *kerma* (de la „*K*inetic *E*nergy *R*eleased in *MA*terial"), care caracterizează energiile cinetice ale particulelor produse indirect de radiaţii. În ambele cazuri, unitatea de măsură pentru energia specifică cedată şi pentru kerma este un rad, şi el se defineşte ca mai sus prin raportul dintre energia cedată (direct sau indirect) şi masa materialului absorbant.

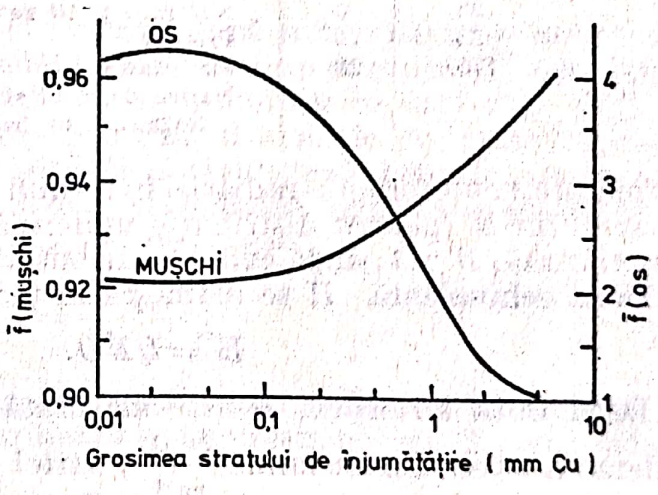


Fig. 1.22. — Factorul $\bar{f}$ mediu al radiaţiilor X sau γ în funcţie de grosimea stratului de înjumătăţire, în apă sau în ţesut moale, ori în os compact.

Energia specifică cedată şi kerma sînt mărimi stochastice, care fluctuează întîmplător în timp ca şi activităţile preparatelor radioactive. Doza absorbită este o mărime nestochastică, ea se mai poate defini ca fiind limita către care tinde energia specifică cedată medie, respectiv kerma medie, atunci cînd masa şi volumul mediului absorbant tind către zero. Diferenţa dintre o mărime stochastică şi una nestochastică este ilustrată de faptul că unităţile de măsură pentru frecvenţe (Hz) şi activităţi (Ci) sînt similare (timp^{-1}); la limită, fenomenele stochastice tind către cele nestochastice (periodice). Pe această bază s-ar putea construi ceasuri cu preparate radioactive de viaţă foarte lungă, observînd că la un

numărător de radioactivitate cu contoare decadice, doar ultimele contoare decadice care numără repede arată fluctuaţii în timp, pe cînd primele contoare prezintă o remarcabilă constanţă în timp cînd viaţa preparatului este lungă şi activitatea ridicată.

Raportul dintre mărimile discutate mai sus şi timpul de iradiere dă doza-debit (sau debitul dozei), debitul energiei specifice cedate, şi debitul kerma ; în toate cazurile, unitatea de măsură este rad/timp.

1.4.3. DOZA ECHIVALENTĂ

Doza echivalentă (sau echivalentul dozei) ţine seama de faptul că în biologie efectele iradierii nu depind numai de energia absorbită în mediul iradiat, ci şi de natura acestei energii precum şi de distribuirea ei în mediul iradiat. Pentru doze absorbite egale, diferitele feluri de radiaţii ionizante, sau acelaşi fel de radiaţii dar de energii diferite, produc efecte biologice diferite. Pentru a se ţine seama de aceste diferenţe, se defineşte factorul de calitate (Q) conform tabelei 1.5. Pentru a se ţine seama de distribuirea

TABELA 1.5

Factorul de calitate Q (în apă sau ţesut moale), în funcţie de transferul liniar de energie mediu şi de natura radiaţiilor [78]

LET keV/μm	Q	Radiaţii	Q
$\leqslant 3{,}5$	1	Radiaţii X, γ, β^+, β^-	1
7	2	Neutroni < 10 keV	3
23	5	Neutroni $\geqslant 10$ keV	10
53	10	Protoni	1—10
175	20	Particule α	1—20
		Nuclee de recul şi fragmente de fisiune	20

uniformă sau neuniformă a radiaţiei în mediul iradiat, se defineşte factorul de distribuţie N (pentru distribuţie uniformă, $N = 1$; pentru distribuţie neuniformă, $N > 1$, după cum e distribuţia).

Doza echivalentă H se defineşte în ţesutul sau organul iradiat ca

$$H = QND.$$

Dacă doza absorbită D este măsurată în rad, produsul QN este considerat a avea dimensiunile $\frac{\text{rem}}{\text{rad}}$, astfel că doza echivalentă H se măsoară în unităţi numite rem (de la „*R*oentgen *E*quivalent *M*an"). În sistemul internaţional SI care foloseşte pentru doza absorbită unităţi gray (Gy) în loc de rad, s-a aprobat pentru doza echivalentă unitatea 1 *sievert* (Sv) $= D$ (Gy) $\times Q \times N = 100$ rem.

Anterior au existat şi alte încercări de a ţine seama de efectul biologic al radiaţiilor, dar Comisia Internaţională pentru Unităţi şi Măsători de Radiaţie (ICRU, International Commission on Radiation Units and Measurements) a decis să se înlocuiască vechea mărime, doza RBE (*R*elative *B*iologically *E*ffective Dose) prin doza echivalentă aşa cum s-a arătat mai sus [79].

Scanned with OKEN Scanner

1.4.4. CONSTANTA DEBITULUI DE EXPUNERE LA RADIAȚII (Γ_δ)

Γ_δ a unui nuclid radioactiv emițînd fotoni se definește ca fiind:

$$\Gamma_\delta = \frac{l^2}{A}\left(\frac{X}{t}\right)_\delta \quad \left(\text{în } \frac{\text{R}\cdot\text{m}^2}{\text{h}\cdot\text{Ci}}\right),$$

adică debitul expunerii (în R/h) datorită fotonilor de energie mai mare decît δ (în keV) la o distanță l de sursa punctuală avînd o activitate A (în Ci). Fotonii pot fi radiații X, γ, sau radiație de frînare. Unitatea mai veche Γ (constanta specifică a radiațiilor γ), care nu se referea decît la radiații γ, a fost abandonată.

Se poate calcula constanta debitului de expunere Γ_∞ la distanțe $l > 1$ m, după expresia

$$\Gamma_\infty = 19{,}9 \sum_i n_i E_i \mu_i,$$

unde n_i este fracțiunea fotonilor de energie E_i (în MeV), iar μ_i este coeficientul masic de absorbție în aer pentru acești fotoni (în cm^2/gram aer).

1.4.5. DOZA ABSORBITĂ INTERN [80—87]

Produșii radiofarmaceutici sînt administrați oral sau intravenos, pentru diagnostic sau terapie. Ei se distribuie de obicei neuniform, localizîndu-se în anumite organe. Comisia Internațională pentru Protecția Radiologică a normat „omul standard" definind [80] masa fiecărui organ, după tabela 1.6.

Radioactivitatea corpului uman, după administrarea intenționată sau accidentală a unui radionuclid, scade în timp datorită (1) dezintegrării radioactive caracterizată de timpul de înjumătățire fizic $T_{1/2}$, și (2) eliminării fiziologice caracterizate prin timpul biologic de înjumătățire, T_b. Acesta este timpul în care concentrația unei substanțe introdusă în organism scade la jumătate prin excreție ori metabolizare. Rezultatul global este un timp efectiv de înjumătățire, T_{ef}, dat de relația:

$$T_{ef} = \frac{T_b T_{1/2}}{T_b + T_{1/2}}.$$

Unitățile în care se măsoară acești timpi trebuie să fie aceleași (ani, zile, ore, minute). În cele ce urmează se va presupune că T_{ef} este măsurat în zile.

Doza internă datorită radiațiilor nepenetrante (β^+, β^-, CI, electroni Auger, radiații X și γ de energii sub 11,3 keV) se poate calcula dacă se cunosc energia medie, E_{med}, a radiației (în MeV) și concentrația radionuclidului în țesut, C (în μCi/gram de țesut). Se poate calcula doza absorbită în țesutul respectiv după relația:

$$D(\text{în rad}) = E_{med}(\text{MeV})\cdot C\left(\frac{\mu\text{Ci}}{\text{g. țesut}}\right)\cdot T_{ef}(\text{d})\cdot 3{,}7\cdot 10^4(\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{Ci}^{-1})\times$$

$$\times\ 86400\left(\frac{s}{d}\right)\cdot 1{,}6\cdot 10^{-6}\left(\frac{\text{erg}}{\text{MeV}}\right)\cdot\frac{1}{100}\left(\frac{\text{rad. g}}{\text{erg}}\right) = 73{,}8\ E_{med} C T_{ef}.$$

Scanned with OKEN Scanner

Doza internă datorată radiațiilor penetrante (fotoni γ sau X de energii peste 11,3 keV) se calculează după expresii mai complicate care țin seama de faptul că doar o parte Φ_i din energia radiațiilor este reținută în țesut; dacă n_i este fracțiunea de fotoni de energie E_i (în MeV), atunci:

$$D(\text{în rad}) = 73{,}8 \cdot C \cdot T_{ef} \sum_i n_i E_i \Phi_i.$$

TABELA 1.6

Omul standard adult [80]

Organ	Masă (g)	Procent față de masa totală (%)	$\bar{g}$
Masa totală a corpului	70 000	100	126
Mușchi	30 000	43	—
Piele și țesut subcutanat	6 100	8,7	—
Grăsime	10 000	14	—
Schelet			
Oase	7 000	10	—
Măduvă roșie	1 500	2,1	—
Măduvă galbenă	1 500	2,1	—
Sînge	5 400	7,7	—
Țesut gastrointestinal	2 000	2,9	—
Ficat	1 700	2,4	61
Creier	1 500	2,1	67
Plămîni (2)	1 000	1,4	72
Țesut limfatic	700	1,0	—
Rinichi (2)	300	0,43	33
Inimă	300	0,43	—
Splină	150	0,21	18
Vezica urinară	150	0,21	—
Pancreas	70	0,10	17
Glande salivare (6)	50	0,071	—
Testicule (2)	40	0,057	—
Măduva spinării	30	0,043	—
Ochi (2)	30	0,043	—
Glanda tiroidă	20	0,029	11
Dinți	20	0,029	—
Prostata	20	0,029	—
Glande suprarenale (2)	20	0,029	—
Timus	10	0,014	—
Ovare (2)	8	0,011	—
Hipofiza	0,6	0,0009	—
Paratiroide (4)	0,15	0,0002	—
Diverse (vase sangvine, nervi, cartilagii)	390	0,56	—

Cele două expresii se pot combina într-una singură cînd nuclidul este emițător β sau γ:

$$D(\text{în rad}) = 73{,}8 \cdot C \cdot T_{ef}(E_{med} + \sum_i n_i E_i \Phi_i).$$

Pentru fotoni X sau γ expunerea la radiații prin iradierea internă se poate calcula după expresia

$$D_\infty(\text{în R}) = 0{,}024 \left(\frac{\text{cm}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{Ci}}{\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \mu\text{Ci}}\right)\left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)\left(\frac{\text{R} \cdot \text{m}^2}{\text{h} \cdot \text{Ci}}\right) g(\text{cm})\ C\left(\frac{\mu\text{Ci}}{\text{g țesut}}\right) T_{ef}(\text{zile}),$$

unde g este un factor dependent de geometria organului, iar ceilalţi termeni au fost explicaţi mai înainte. Factorul geometric g_{centru} pentru un organ sferic de rază r este (considerînd expunerea în centrul organului)

$$g_{centru} = \frac{4\pi}{\mu}(1 - e^{-\mu r}) = 4\pi r \text{ (pentru } r < 10 \text{ cm)}.$$

Factorul geometric mediu pentru tot organul este

$$\bar{g} = \frac{3}{4} g_{centru} = 3\pi r \text{ (pentru } r < 10 \text{ cm)}.$$

Pentru organe de formă mai complicată, determinările s-au efectuat folosind „fantome" cu forme adecuate, fie prin calcule Monte Carlo (metoda Comitetului Medical pentru Doza Internă de Radiaţii, [88], Medical Internal Radiation Dose Committee, MIRD), fie prin determinări experimentale clasice. Datele concordă bine în ambele cazuri. Cîteva valori $\bar{g}$ sînt incluse în tabela 1.6. Tabela 1.7 prezintă unele date de dozimetrie a radionuclizilor mai importanţi în medicina nucleară. Tot în tabela 1.7 sînt prezentate debitul dozei absorbite β^- şi/sau γ, precum şi doza absorbită maximă în ţesuturi conţinînd o concentraţie medie de radioizotop $C = 1$ μCi/gram ţesut, conform relaţiilor :

$$\text{debitul dozei absorbite } \beta^- = 51{,}2 \cdot E_{\beta,\,med} \cdot C \left(\frac{\text{rad}}{\text{zi}}\right),$$

$$\text{debitul dozei absorbite } \gamma = 0{,}024\, \Gamma_{\delta\rho}\, \bar{g}\, C \left(\frac{\text{rad}}{\text{zi}}\right).$$

Doza absorbită maximă a fost calculată considerînd că timpul efectiv de înjumătăţire poate avea ca valoare maximă timpul fizic de înjumătăţire radioactivă ; această valoare a fost luată în calcule. Cînd se cunoaşte timpul biologic de înjumătăţire, trebuie efectuată corecţia respectivă.

În ciuda timpului fizic de înjumătăţire mai lung, ^{125}I duce la o doză absorbită totală $\beta + \gamma$ mai mică decît ^{131}I, ceea ce a făcut ca unii autori[90] să prefere ^{125}I faţă de ^{131}I pentru unele diagnostice ; nu toţi medicii sînt însă de acord cu aceste concluzii. În orice caz, există însă unanimitate de vederi privind faptul că ^{123}I dă cele mai mici doze absorbite dintre toţi radionuclizii utili ai iodului. Acest fapt va face ca, în ciuda costului ridicat al ^{123}I obţinut la ciclotron, ^{123}I să devină din ce în ce mai utilizat.

1.4.6. PROTECŢIA CONTRA RADIAŢIILOR [91—97]

S-a constatat încă de către pionierii studiului radioactivităţii că radiaţiile ionizante au efecte biologice dăunătoare, atît locale cît şi generale (boala de iradiere).

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 1.7

Date privind dozimetria radionuclizilor mai importanţi în medicina nucleară [31, 36, 89]

Nuclid	Radiaţie	$T_{1/2}$	E_β, medie MeV	Debitul dozei β absorbite $\frac{\text{rad. g. ţesut}}{\text{zile. } \mu\text{Ci}}$	Doza β absorbită maximă $\frac{\text{rad. g. ţesut}}{\mu\text{Ci}}$	Γ_δ $\frac{\text{cm}^2\text{. rad}}{\mu\text{Ci. h}}$	Debitul dozei γ medii absorbite $\frac{\text{rad. g. ţesut}}{\text{zile. } \mu\text{Ci}}$	Doza absorbită γ maximă $\frac{\text{rad. g. ţesut}}{\mu\text{Ci}}$
^{3}H	β^-	12,3 a	0,0057	0,288	—	0	0	0
^{11}C	β^+	20,3 min	0,390	19,95	0,406	5,64	0,135 $\bar{g}$	0,00275 $\bar{g}$
^{14}C	β^-	5730 a	0,049	2,52	—	0	0	0
^{18}F	β^+	109,7 min	0,244	12,5	1,37	5,5	0,132 $\bar{g}$	0,0145 $\bar{g}$
^{22}Na	β^+, γ	2,62 a	0,190	9,73	—	11,5	0,277 $\bar{g}$	—
^{24}Na	β^-, γ	15 h	0,555	28,3	25,5	17,4	0,418 $\bar{g}$	0,355 $\bar{g}$
^{32}P	β^-	14,3 d	0,695	36,0	734	0	0	0
^{35}S	β^-	88 d	0,049	2,51	318	0	0	0
^{42}K	β^-, γ	12,4 h	1,427	72,7	54,2	1,30	0,0336 $\bar{g}$	0,0232 $\bar{g}$
^{45}Ca	β^-, γ	165 d	0,076	3,89	925	0	0	0
^{47}Ca	β^-, γ	4,5 d	0,332	17,0	111	5,45	0,131 $\bar{g}$	0,854 $\bar{g}$
^{51}Cr	CE, γ	27,8 d	0,0056	0,287	11,5	0,173	0,00416 $\bar{g}$	0,167 $\bar{g}$
^{52}Fe	β^+, γ	8,2 h	0,193	9,87	4,87	3,95	0,0948 $\bar{g}$	0,0467 $\bar{g}$
^{59}Fe	β^-, γ	45 d	0,120	6,14	398	5,95	0,143 $\bar{g}$	9,53 $\bar{g}$
^{57}Co	CE, CI, γ	270 d	0,022	1,12	438	0,845	0,0207 $\bar{g}$	7,89 $\bar{g}$
^{60}Co	β^-, γ	5,26 a	0,095	4,86	—	12,4	0,297 $\bar{g}$	—
^{75}Se	CE, γ	120 d	0,0196	1,00	173	1,96	0,0470 $\bar{g}$	8,16 $\bar{g}$
^{90}Sr	β^-	28,1 a	0,200	10,25	—	0	0	0
^{99m}Tc	CI, γ	6 h	0,017	0,85	0,306	0,718	0,172 $\bar{g}$	0,0062 $\bar{g}$
^{113m}In	γ	100 min	0,130	6,65	0,667	1,69	0,0406 $\bar{g}$	0,00405 $\bar{g}$
^{123}I	CE, γ	13,3 h	0,0298	1,52	1,218	1,52	0,0364 $\bar{g}$	0,0291 $\bar{g}$
^{125}I	CE, CI, γ	60 d	0,0213	1,09	90,0	1,34	0,0322 $\bar{g}$	2,78 $\bar{g}$
^{131}I	β^-, γ	8,05 d	0,188	9,63	112	2,12	0,0510 $\bar{g}$	0,591 $\bar{g}$
^{133}Xe	β^-, CI, γ	5,27 d	0,136	6,96	52,8	0,486	0,0117 $\bar{g}$	0,0886 $\bar{g}$
^{197}Hg	CE, CI, γ	65 h	0,979	4,04	15,8	0,319	0,00765 $\bar{g}$	0,030 $\bar{g}$
^{203}Hg	β^-, γ	46,9 d	0,099	5,06	342	1,25	0,030 $\bar{g}$	2,06 $\bar{g}$
^{198}Au	β^-, γ	2,7 d	0,328	16,8	65,1	2,19	0,0527 $\bar{g}$	0,204 $\bar{g}$

Scanned with OKEN Scanner

Radioprotecţia trebuie să urmărească minimizarea efectelor atît asupra grupei de populaţie A, cu expunere profesională, a radiochimiştilor, radiofarmaciştilor, radiologilor şi personalului medical care administrează produşi radiofarmaceutici, cît şi asupra restului populaţiei (pacienţilor) formînd grupa B. Grija faţă de populaţie este cea care favorizează din ce în ce mai mult utilizarea radiofarmaceuticelor de viaţă scurtă conţinînd radioizotopi emiţători γ de energie relativ joasă, cum este ^{99m}Tc (într-o clasificare mai veche, astăzi depăşită, mai există o grupă de populaţie intermediară, cu expunere ocazională la radiaţii).

După această împărţire, dozele echivalente maxime admise sînt prezentate în tabela 1.8. Trebuie menţionat că DL_{50} este de 250—350 rem.

TABELA 1.8

Doza echivalentă anuală maximă admisă

Organ critic iradiat extern şi/sau intern	Doza echivalentă maximă (rem/an)	
	Grupa A	Grupa B
Corp total, măduvă, ochi, gonade	5	0,5*
Piele, tiroidă, ţesuturi moi	15	1,5
Braţe	30	3
Palme şi degete, oase	75	7,5

* Dar într-o săptămînă maximum 0,1 rem, iar într-o oră maximum 2 mrem.

Se pare că nu există o doză prag minimă, neprimejdioasă de radiaţii, căci orice spor de iradiere a gonadelor (celulelor sexuale) duce la creşterea numărului malformaţiilor şi riscului de cancer. La om, o doză absorbită de aprox. 20 rad (acut) sau aprox. 100 rad (cronic) duce la dublarea frecvenţei mutaţiilor genetice. De aceea, în decursul ultimilor 15 ani, doza maximă admisă a fost coborîtă continuu. Există în organism un mecanism reparator, ceea ce face ca doza maximă anuală să nu poată fi concentrată într-un interval oricît de scurt, ci trebuie lăsat timp pentru acţionarea acestui mecanism reparator; cifrele prezentate în nota de picior a tabelei 1.8 exemplifică acest lucru. De ex. iradierea internă cu 0,1 μCi de radiu fixat în ţesutul osos dă doza maximă permisă; în acest fel se poate determina şi concentraţia maximă posibilă a altor radionuclizi cu fixare osoasă (^{90}Sr, ^{18}F), considerînd oasele drept „organ critic". Dacă radionuclidul se acumulează în alte organe (de ex. ^{35}S şi ^{127m}Tl în gonade), se calculează activitatea maximă cu gonadele ca organ critic, combinînd datele din tabelele 1.6 şi 1.7. Atunci cînd radionuclidul se distribuie uniform în fluxul sanguin, se calculează activitatea maximă permisă considerînd ca organ critic întregul corp.

Doza totală echivalentă acumulată în decursul activităţii profesionale a unei persoane de N ani din grupa A nu trebuie să depăşească $5(N-18)$ remi. Femeilor tinere şi îndeosebi celor însărcinate în primele luni li se recomandă iradieri cît mai reduse cu putinţă.

Următoarele reguli sînt utile pentru personalul care utilizează radioizotopi:

— purtarea de halate şi mănuşi chirurgicale;

— manipularea surselor radioactive deschise (gaze, lichide, pulberi) în nişe ventilate;

Scanned with OKEN Scanner

— folosirea de tăvi pentru a evita răspîndirea radioactivităţii în cazul spargerii sticlăriei;
— lucrul pe hîrtie de filtru, în acelaşi scop;
— păstrarea materialelor radioactive în conteinere închise;
— etichetarea cu trifoiul „Radioactiv" a containerelor şi camerelor respective;
— observarea strictă a regulilor de manipulare a substanţelor radioactive (evitarea consumării de alimente, fumatului şi fardatului în încăperile de lucru, interzicerea pipetării cu gura, manipularea surselor intense purtînd ochelari, precum şi folosind ecrane de protecţie şi manipulatoare de la distanţă, evitarea lucrului în laboratoare improvizate sau neautorizate pentru lucrul cu substanţe radioactive);
— instruirea întregului personal;
— purtarea monitoarelor (casete cu film, stilodozimetre) adecvate radiaţiei;
— monitorizarea din punct de vedere dozimetric a aerului, echipamentului şi meselor de lucru şi ţinerea unei evidenţe scrise, pe camere şi persoane;
— efectuarea mai întîi cu probe (inactive) a operaţiilor noi;
— prinderea separată a deşeurilor radioactive solide şi lichide şi tratarea corespunzătoare a acestor deşeuri;
— decontaminarea promptă a echipamentului după folosirea normală sau, în caz de contaminare accidentală, folosind mijloacele cele mai adecvate.

BIBLIOGRAFIE

1. C.D. Nenițescu, „Chimia generală", Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1972.
2. M. Curie, „Radioactivité", Hermann, Paris, 1935.
3. O. Hahn, „Aplied Radiochemistry", Cornell Univ. Press, Ithaca, 1936.
4. C. Wahl, N.A. Bonner, „Radioactivity Applied to Chemistry", Wiley, New York, 1951.
5. S. Grasstone, „Sourcebook on Atomic Energy", 3nd Ed., Van Nostrand, Princeton, New Jersey, 1967.
6. P.K. Richtinger, E.H. Kennard, T. Lauritsen, „Introduction to Modern Physics", Mc Graw-Hill, New York, 1955.
7. A.S. Sanielevici, „Radioactivitatea", Edit. Academiei, Bucureşti, 1956.
8. I. Ursu, „Energia atomică", Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1973.
9. E.V. Spolski, „Fizica atomică", trad. din limba rusă, Edit. tehnică, 2 vol., Bucureşti, 1952—1953.
10. G. Friedländer, J. Kennedy, „Nuclear and Radiochemistry", Wiley, New York, 1955.
11. B.G. Harvey, „Introduction to Nuclear Physics and Chemistry", 2nd Ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1969.
12. E. Segré, „Experimental Nuclear Physics", Wiley, New York, 1953.
13. C. Chiotan, A. Buşilă, G. Fodor, „Izotopii radioactivi şi radiaţiile nucleare în industria chimică", Edit. tehnică, Bucureşti, 1962.
14. R.D. Evans, „The Atomic Nucleus", McGraw-Hill, New York, 1955.
15. M. Haissinski, „La chimie nucléaire et ses applications", Masson, Paris, 1957 (trad. engleză, Addison-Wesley, Reading, 1969; trad. rusă, Izd. inostr. lit., Moskva 1961).
16. M. Lefort, „La Chimie Nucléaire", Dunod, Paris, 1966 (trad. engleză, Van Nostrand, London, 1968).
17. J.M. Blatt, V.F. Weisskopf, „Theoretical Nuclear Physics", Wiley, New York, 1952.
18. E. Fermi, „Nuclear Physics", Univ. of Chicago Press, Chicago, 1950.
19. F. Bunuş, „Izotopii radioactivi", Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1970; „Chimie nucleară", Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1976.
20. R.T. Overman, „Basic Concepts of Nuclear Chemistry", Reinhold, New York, 1963.
21. D.J. Carswell, „Introduction to Nuclear Chemistry", Elsevier, Amsterdam, 1967.
22. J.F. Duncan, G.B. Cook, „Isotopes in Chemistry", Clarendon Press, Oxford, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

23. H.A.C. McKay, „Principles of Radiochemistry", Butterworths, London, 1971.
24. L. Jaffe, „Nuclear Chemistry", Academic Press, London, 1968.
25. C.A. Owen, „Diagnostic Radioisotopes", Blackwell, Oxford, 1959; K.E. Scheer, „Kerntechnik in der Medizn", Thiemig Taschenbücher, No. 33, München, 1968.
26. G.R. Choppin, „Nuclei and Radioactivity", Benjamin, New York, 1964.
27. G.R. Choppin, „Experimental Nuclear Chemistry", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1961.
28. W.J. Whitehouse, J.L. Putman, „Radioactive Isotopes", Clarendon Press, Oxford, 1953.
29. E. Broda, T. Schönefeld, „Die technischen Anwendungen der Radioaktivität", VEB Verlag Technik, Berlin, 1958 (trad. engleză, Pergamon Press, Oxford, 1966).
30. B. N. Taylor, W. H. Parker, D. N. Langenberg, *Rev. Mod. Phys.*, **41**, 375 (1969).
31. W. Seelmann-Eggebert, G. Pfennig, A. Münzel, „Nuklidkarte", 4. Aufl., Kernforschungszentrum Karlsruhe, 1974.
32. G. Gamow, „The Creation of Universe" Viking Press, New York, 1952.
33. IAEA, „Radioactive Dating", Vienna, 1963.
34. IAEA, „Radioactive Dating and Methods of Low Level Coanting", Vienna, 1967.
35. Chart of the Nuclides, General Electric Comp., Knolls Atomic Power Laboratory.
36. C.M. Lederer, J.M. Hollander, I. Perlman, „Table of Isotopes", 6th Ed., Wiley, New York, 1969.
37. L.T. Dillman, Reports of MIRD Committe, Pamphlets 4 and 6, *J. Nucl. Med.*, **10** Suppl. 2 (1969), **11** Suppl. 4 (1970).
38. J.M.A. Lenihan, S.J. Thomson, „Activation Analysis", Academic Press, London, 1965.
39. R.C. Koch, „Activation Analysis Handbook", Academic Press, New York, 1960.
40. T. Năsçuţiu, „Metode radiometrice de analiză", Edit. Academiei, Bucureşti, 1971; „Metode radiochimice de analiză", Edit. Academiei, Bucureşti, 1973.
41. D.J. Hughes, „Neutron Cross Sections", Pergamon Press, London, 1957.
42. S. Ionescu, „Elemente de radiochimie", Edit. tehnică, Bucureşti, 1959.
43. I. Gălăţeanu, „Radiochimia aplicată. Metode şi probleme", Edit. Academiei, Bucureşti, 1976.
44. An. N. Nesmeianov et al., „Lucrări practice de radiochimie", Edit. tehnică, Bucureşti, 1959.
45. N. Murin, V.D. Nefedov, V.P. Svedov (editori), „Radiochimia şi chimia proceselor nucleare", Edit. tehnică Bucureşti, 1963.
46. V.M. Vlovenko, „Sovremennaia radiohimia", Atomizdat, Moskva, 1969.
47. D. Blanc, „Les radioéléments", Masson, Paris, 1966; H.S. Winchell, M.B. Winstead în „Frontiers of Nuclear Medicine" (editor W. Horst), Springer, Berlin, 1971; H. Götte, G. Kloss, *Angew. Chem.*, **85**, 793 (1973); R.D. Evans, *Nucl. Med.*, 1 (1965).
48. C. Mănţescu, O. Constantinescu, „Chimia radiaţiilor", Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1969.
49. M. Fiti, „Dozimetria chimică a radiaţiilor ionizante", Edit. Academiei, Bucureşti, 1973.
50. S. Ionescu, „Reacţii chimice induse de radiaţiile ionizante", Edit. Academiei, 1963.
51. J.W.T. Spinks, R.J. Woods, „An Introduction to Radiation Chemistry", Wiley, New York, 1964.
52. P. Ausloos, „Fundamental Processes in Radiation Chemistry", Interscience, New York, 1968.
53. M. Burton, J.L. Magee (editori), „Advances in Radiation Chemistry", Interscience, New York, 1969.
54. J.H. O'Donnel, D.F. Sangster, „Principles of Radiation Chemistry", Elsevier, Amsterdam, 1970.
55. M. Haissinski (editor), „Chemical and Biological Actions of Radiation", vol. 1, Masson, Paris, 1955.
56. J, Swallow, „Radiation Chemistry. An Introduction", Wiley, New York, 1973; „Radiation Chemistry of Organic Compounds", Pergamon Press, Oxford, 1960.
57. I.G. Draganic, Z.D. Draganic, „The Radiation Chemistry of Water", Academic Press, New York, 1971.
58. A. Charlesby, „Atomic Radiation and Polymers", Pergamon Press, Oxford, 1960.
59. A.O. Allen, „The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions", Van Nostrand, Princeton, 1961.
60. A. Chapiro, „Radiation Chemistry of Polymeric Systems", Interscience, New York, 1962.
61. L. Wilets, „Theory of Nuclear Fission", Clarendon Press, Oxford, 1964.
62. I. Maxim, „Materiale nucleare", Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
63. A. Salmon, „The Nuclear Reactor", Methuen, London, 1964.
64. M.C. Oncescu, „Fizica protecţiei contra radiaţiilor", Edit. Academiei, Bucureşti 1958.
65. N. Feather, *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **34**, 599 (1938).
66. W. Wolf, în „Radiopharmacy" (editori M. Tubis şi W. Wolf), Wiley — Interscience, New York, 1976.

Scanned with OKEN Scanner

67. W.R. Hendee, „Radioactive Isotopes in Biological Research", Wiley — Interscience, New York, 1973.
68. E. Powsner, D. Raeside, „Diagnostic Nuclear Medicine", Grune and Stratton, New York, 1971.
69. H.L. Johns, J.S. Laughlin, în „Radiation Dosimetry" (editori G.J. Hine și G.L. Brownell), Academic Press, New York, 1956.
70. H.E. Johns, „The Physics of Radiation Therapy", Thomas, Springfield, I11., 1953.
71. P. Blichert-Taft, „Radioatoms in Nuclear Medicine", Nilsson, Gothenburg, Sweden, 1968.
72. W.R. Hendee, „Medical Radiation Physics", Year Book Medical Publishers, Chicago, 1970.
73. E. Smith, în „Principles of Nuclear Medicine", H. Wagner (editor), Saunders, Philadelphia, 1968.
74. E.F. Gloyna, J.O. Ledbetter, „Principles of Radiological Health", Dekker, New York, 1969.
75. H.Blatz, „Introduction to Radiological Health", McGraw-Hill, New York, 1964.
76. S. Silver. „Radioactive Nuclides in Medicine and Biology. Medicine", 3nd ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1968.
76a. Z. Spurný, *Radiochem. Radioanalyt. Letters*, **33**, 187 (1978).
76b. H. O. Wyckoff, Proc. 4th Int. Congress of IRPA, Paris, **2**, 681 (1977).
76c. H. Brunner, *ibid.*, 1, 77 (1977).
77. International Commisson on Radiation Units and Measurements, „Radiation Quantities and Units", ICRU Report 19, Government Printing Office, Washington, D.C., 1971.
78. International Commisson on Radiological Protection, „Recommendations of the ICRP No. 9", Pergamon Press, Oxford, 1966.
79. International Commission on Radiation Units and Measurements, „Recommendations of ICRU", Report 10b, Government Printing Office, US National Bureau of Standards Handbooks 85—89, Washington, 1962.
80. International Commission on Radiological Protection Report of Committee. II. Permissible Dose for Internal Radiation. ICRP Publ. 2, Pergamon Press, New York, 1969.
81. J.P. Miller, *Nucl. Med., Suppl,.* 29 (1968).
82. S.G. Schulman, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1745 (1973).
83. E.M. Smith, în „Recent Advances in Nuclear Medicine", Symposium 1966, p. 85.
84. E.M. Smith, în „Radioactive Pharmaceuticals" (editori G. A. Andrews, R.M. Kniseley, H.N. Wagner, Jr.), Proc. Symp. Oak Ridge, USAEC, 1966, p. 649.
85. G.V. Le Roy, *ibid.*, p. 669.
86. R. Loevinger, J.G. Holt, G.J. Hine, în „Radiation Dosimetry", (editori G.J. Hine și G.L. Brownell), Academic Press, New York, 1956, p. 803.
87. World Health Organization, „Public Health and the Medical Uses of Ionizing Radiation", 5th Report of the WHO Expert Committee on Radiation, WHO Technical Reports Series No. 306, Geneva, 1965.
88. G.L. Brownell, W.H. Ellett, A.R. Reddy, Reports of MIRD Committee Pamphlet 3, *J. Nucl. Med.*, **9**, Suppl. 1, 27 (1968);
W.H. Ellett, R .M. Humes, Pamphlet 8, *ibid.*, **12**, Suppl. 5, 25 (1971).
89. M.A. Greenfield, R.B. Lane, în „Radiopharmacy" (editori M. Tubis și W. Wolf), Wiley, Interscience, New York, p. 179.
90. I.R. Mc Dougall, W.G. Greig, F.C. Gillespie, în „Radioactive Isotope in Klinik und Forschung", vol. 10 (editori K. Gellinger și R. Höfer), Gasteiner Internationales Symposium, 1972, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, 1973, p. 243.
91. IAEA, „Safe Handling of Radioisotopes", IAEA Safety Series No. 2, Viena, 1960.
92. IAEA, „Basic Safety Standards for Radiation Protection", IAEA Safety Series No. 9, Viena, 1962.
93. M. Rubin, G. Casarett, „Chemical Radiation Pathology", vol. 1, Saunders, Philadelphia, 1968.
94. H. Dertinger, U. Jung, „Molecular Radiation Biology", Springer, New York, 1970.
95. E. Hall, „Radiobiology for the Radiologist", Harper and Row, New York, 1973.
96. A. Upton, „Radiation Injury", Univ. of Chicago Press, Chicago, 1969.
97. J.D. Abbatt, J.R.A. Lakey, D.J. Mathias, „Protection contre les radiations", Masson, Paris, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

METODE DE PRODUCERE A IZOTOPILOR FOLOSIȚI ÎN OBȚINEREA COMPUȘILOR MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI

2.1. SECȚIUNEA EFICACE A REACȚIEI NUCLEARE

Izotopii radioactivi se obțin prin intermediul reacțiilor nucleare ca urmare a interacțiunii neutronilor, particulelor încărcate (protoni, deuteroni și particule α) și a fotonilor cu nucleele stabile, avînd loc o transformare a acestora în nuclee radioactive. O reacție nucleară se caracterizează prin secțiunea eficace (σ) care exprimă probabilitatea P cu care aceasta se poate produce, în unitatea de timp. Avînd în vedere că în realitate nucleele stabile sînt bombardate de un flux de neutroni, sau un fascicul de particule încărcate sau fotoni, secțiunea eficace reprezintă numărul de reacții nucleare individuale ce au loc într-o secundă, pe unitatea de flux raportat la un nucleu stabil al elementului din care este constituită ținta.

Secțiunea eficace se măsoară în unități de suprafață denumite „barni", 1 barn $= 10^{-24}$ cm^2, ea este o mărime caracteristică fiecărui nucleu și depinde de natura reacției nucleare și de energia cinetică a particulelor (n, p, d, γ) care bombardează ținta.

În general o reacție nucleară (la nivelul cunoștințelor actuale) are loc în trei etape succesive în decurs de aproximativ 10^{-20}s. În prima etapă particula incidentă în urma interacțiunii ei cu nucleul atomului elementului respectiv din ținta bombardată se aglomerează în acesta formînd un nucleu compus ce posedă un exces de energie. În etapa a doua are loc o repartizare a excesului de energie pe toate particulele (nucleoni) constituente ale nucleului compus. Această repartizare de energie nu este uniformă, ea prezintă fluctuații statistice, astfel că la un moment dat unul sau mai mulți nucleoni pot primi o cantitate importantă de energie, determinînd o modificare a stărilor energetice ale acestora. Ca urmare a acumulării excesului de energie de către unul sau mai ulți nucleoni aceștia pot ieși din nucleul compus învingînd forțele de atracție a nucleului și provocînd astfel, în etapa a treia, descompunerea nucleului compus și formarea, în final, a unui alt nucleu, care, în general, este radioactiv.

2.2. RADIOIZOTOPI OBȚINUȚI ÎN REACTOARELE NUCLEARE

2.2.1. REACȚII NUCLEARE (n, γ) [3—6]

Datorită faptului că neutronii, spre deosebire de particulele încărcate, care trebuie să străbată bariera de potențial, pot pătrunde în orice nucleu, ei produc ușor reacții nucleare. În funcție de energia lor, neutronii pot produce diferite tipuri de reacții nucleare (n, γ), (n, p), (n, α), $(n, 2n)$, (n, np) etc., dintre care cele mai des folosite în practica producției de radioizotopi la reactoarele nucleare sînt (n, γ), (n, p) și $(n,$ fisiune). La energii mai mici de 0,5 eV, denumite energii de rezonanță, neutronii produc reacții (n, γ) care au o secțiune eficace mare, proporțională cu $\frac{1}{v}$ unde v reprezintă viteza (energia cinetică) neutronilor termici. O astfel de reacție se poate scrie sub formă de ecuație, notînd cu Z numărul atomic al nucleului și cu A masa lui :

$$ {}^{A}_{Z}\mathrm{M} + {}^{1}n \longrightarrow ({}^{A+1}_{Z}\mathrm{M})^{*} \longrightarrow {}^{A+1}_{Z}\mathrm{M} + \gamma \qquad (2.1) $$

unde termenul din paranteză reprezintă nucleul compus care fiind instabil se descompune și se formează nucleul de masă $A + 1$, iar surplusul de energie este eliberat sub formă de cuante γ. Majoritatea radioizotopilor produși în reactoarele nucleare se obțin prin reacții nucleare (n, γ) folosind neutronii termici în calitate de proiectile bombardante. Radioizotopul rezultat din această reacție are aceeași natură chimică ca aceea a elementului țintă și din această cauză, el nu se poate separa prin metode chimice, fapt ce duce la limitarea activității specifice. Dintre reacțiile (n, γ) mai importante care stau la baza proceselor tehnologice de producție a unor radioizotopi menționăm :

$^{197}\mathrm{Au}(n, \gamma)^{198}\mathrm{Au}$	$^{196}\mathrm{Hg}(n, \gamma)^{197}\mathrm{Hg}$	$^{64}\mathrm{Zn}(n, \gamma)^{65}\mathrm{Zn}$
$^{58}\mathrm{Fe}(n, \gamma)^{59}\mathrm{Fe}$	$^{202}\mathrm{Hg}(n, \gamma)^{203}\mathrm{Hg}$	$^{74}\mathrm{Se}(n, \gamma)^{75}\mathrm{Se}$
$^{23}\mathrm{Na}(n, \gamma)^{24}\mathrm{Na}$	$^{50}\mathrm{Cr}(n, \gamma)^{51}\mathrm{Cr}$	$^{191}\mathrm{Ir}(n, \gamma)^{192}\mathrm{Ir}$
$^{81}\mathrm{Br}(n, \gamma)^{82}\mathrm{Br}$	$^{59}\mathrm{Co}(n, \gamma)^{60}\mathrm{Co}$	$^{44}\mathrm{Ca}(n, \gamma)^{45}\mathrm{Ca}$
$^{98}\mathrm{Mo}(n, \gamma)^{99}\mathrm{Mo}$	$^{112}\mathrm{Sn}(n, \gamma)^{113}\mathrm{Sn}$	$^{41}\mathrm{K}(n, \gamma)^{42}\mathrm{K}$

Radionuclizii obținuți în urma acestui tip de reacție nucleară și, în general, a tuturor celorlalte tipuri menționate mai sus se dezintegrează după anumite scheme, funcție de raportul $(A-Z)/Z$. Astfel, stabilitatea unui nucleu depinde de raportul dintre numărul neutronilor și numărul protonilor constituenți.

Pentru ca să aibă loc o dezintegrare spontană a nucleului este necesar ca energia de legătură a particulei emise ca urmare a acestei dezintegrări, să fie negativă adică $\Sigma M_f - M_i < 0$, în care M_f reprezintă suma maselor sistemului final (nucleul rezultat + particula emisă), iar M_i masa sistemului inițial (nucleul generator). Tipul de schemă de dezintegrare depinde de caracterul impar sau par al numărului de masă A și al celui atomic Z. De exemplu, dezintegrarea unui radionuclid cu Z impar și A par poate avea loc prin emiterea unui electron (tranziție β^-) sau a unui pozitron (tranziție β^+). În primul caz numărul atomic al radionuclidului rezultat crește cu o unitate, pe cînd în al doilea caz acesta scade cu o

unitate, iar numărul de masă rămîne acelaşi ca al nucleului generator. Cînd dezintegrarea are loc prin emiterea unei cuante γ sau prin tranziţie izomerică, numărul atomic atît al nucleului generator cît şi cel al nucleului rezultat rămîne neschimbat.

În anumite cazuri ale reacţiilor (n, γ) radionuclidul rezultat se poate separa, datorită modificării formei chimice în urma reculului nuclear, de elementul ţintă deşi au aceleaşi proprietăţi chimice. Astfel de radionuclizi se pot obţine în stare „fără purtător" adică conţine numai atomii radioactivi ai radionuclidului respectiv ca de exemplu: ^{51}Cr, ^{38}Cl, ^{80}Br, ^{82}Br, ^{128}I, ^{56}Mn etc.

2.2.2. REACŢII NUCLEARE (n, p) ŞI (n, α) [3—6]

Pentru efectuarea acestui tip de reacţie nucleară în care din nucleu se elimină un proton şi pentru ca acesta să învingă bariera de potenţial este necesar ca neutronii să aibă energii de peste 2 MeV, mult mai mari decît în cazul reacţiilor (n, γ).

În acest caz radionuclidul rezultat are o natură chimică diferită de cea a elementului ţintă, iar prin separări radiochimice acesta poate fi izolat din matricea lui în formă „fără purtător" şi astfel se asigură activităţi specifice înalte.

Secţiunea eficace a reacţiei (n, p) în general este mică în comparaţie cu cea a reacţiei (n, γ), ceea ce limitează utilizarea acestui tip de reacţie pentru producţia curentă de radioizotopi doar la cîţiva, dintre care mai importanţi sînt:

$^{14}N(n, p)^{14}C$ $\qquad$ $^{58}Ni(n, p)^{58}Co$

$^{35}Cl(n, p)^{35}S$ $\qquad$ $^{27}Al(n, p)^{27}Mg$

$^{32}S(n, p)^{32}P$ $\qquad$ $^{131}Te(n, p)^{131}I$

Reacţia (n, α) se foloseşte destul de rar în producţia curentă de radioizotopi, doar în cazul obţinerii tritiului, argonului şi sodiului:

$^{6}Li(n, \alpha)^{3}H$, $^{27}Al(n, \alpha)^{24}Na$; $^{40}Ca(n, \alpha)^{37}Ar$ etc.

2.2.3. REACŢII NUCLEARE SECUNDARE

Prin reacţii nucleare secundare aici se înţeleg acele reacţii în care nucleul ţintă captează un neutron formînd un nuclid radioactiv şi se emite o cuantă γ, urmînd ca acesta la rîndul lui, printr-o dezintegrare radioactivă de tip β^-, β^+ sau mai rar captură K, să formeze un radionuclid-fiică şi care obişnuit, are o natură chimică diferită de cea a nuclidului ţintă. Acest fapt permite de a folosi metode chimice şi fizico-chimice de separare a lui din ţinta iradiată şi astfel să se obţină în formă „fără purtător" sau cu mici adaosuri de purtător, cu activităţi specifice înalte. Astfel de reacţii nucleare mai des folosite în producţia radioizotopilor sînt:

$$^{130}Te(n, \gamma)^{131}Te \quad T_{1/2} = 24{,}8 \text{ min} \xrightarrow{\beta^-} {}^{131}I$$

$$^{124}Xe(n, \gamma)^{125}Xe \quad T_{1/2} = 18 \text{ h} \xrightarrow{\text{C.E.}} {}^{125}I$$

$$^{198}Pt(n, \gamma)^{199}Pt \quad T_{1/2} = 30{,}8 \text{ min} \xrightarrow{\beta^-} {}^{199}Au$$

$$^{76}Ge(n, \gamma)^{77}Ge \quad T_{1/2} = 11{,}3 \text{ h} \xrightarrow{\beta^-} {}^{77}As$$

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, din această categorie de reacţii nucleare mai fac parte şi altele, mai ales acelea care stau la baza formării de perechi de radionuclizi (părinte-fiică) denumiţi generatori şi care se vor descrie în paragraful 2.5

2.2.4. REACŢIA DE FISIUNE A ^{235}U ŞI A ^{239}Pu [5—7]

Nucleele de ^{235}U şi ^{239}Pu captînd în reactoarele nucleare cîte un neutron termic devin foarte instabile deoarece au un mare exces de neutroni. Această stare de instabilitate a nucleelor grele provocată de un înalt grad de excitaţie, durează un timp extrem de scurt, de circa 10^{-18} s, după care acestea fisionează în două grupe de fragmente, asimetrice din punctul de vedere al maselor, avînd raportul 3 : 2; prima grupă cuprinde radionuclizii de fisiune ce au masele $A = 72 - 117$ (grupa uşoară), iar a doua grupă $A = 119 - 161$ (grupa grea), după cum se vede din ecuaţia fisiunii :

$$^{235}_{92}U + ^{1}_{0}n \longrightarrow ^{A_1}_{Z_1}X + ^{A_2}_{Z_2}Y + \nu\,^{1}_{0}n + \gamma + Q \qquad (2.2)$$

În această ecuaţie X şi Y sînt fragmentele de fisiune de masă A_1 şi A_2 cu numerele atomice Z_1 şi Z_2, ν reprezintă numărul neutronilor emişi la un act de fisiune (2—3 neutroni), γ numărul de cuante gamma emise la un act de fisiune (6—8 fotoni), iar Q energia eliberată în procesul de fisiune, de aproximativ 200—210 MeV/act fisiune. Din procesul de fisiune rezultă în total circa 300 produşi radioactivi de fisiune (radionuclizi) deoarece fiecare fragment din cele aproximativ 81 fragmente de fisiune formează cîte o familie de 3—5 radionuclizi descendenţi ca urmare a dezintegrării lor radioactive, de exemplu :

$$^{140}_{54}Xe \xrightarrow{\beta^-} {}^{140}_{55}Cs \xrightarrow{\beta^-} {}^{140}_{56}Ba \xrightarrow{\beta^-} {}^{140}_{57}La \xrightarrow{\beta^-} {}^{140}_{58}Ce\ (stabil)$$

$$^{94}_{38}Sr \xrightarrow{\beta^-} {}^{94}_{39}Y \xrightarrow{\beta^-} {}^{94}_{40}Zr\ (stabil)$$

Procesul de fisiune a devenit actualmente o bogată sursă de obţinere a radioizotopilor cu exces de neutroni, β^- activi „fără purtător" prin separarea lor din produşii de fisiune cu ajutorul metodelor radiochimice. Dintre radioizotopii obţinuţi din produşii de fisiune cu utilizare curentă în industrie sînt : ^{90}Sr, ^{140}Ba, ^{95}Zr, ^{95}Nb, ^{137}Cs, ^{131}I şi unii radionuclizi ai elementelor pămînturilor rare, iar cu utilizare în medicină şi biologie : ^{99}Mo (pentru generatorii de ^{99m}Tc), ^{132}Te (pentru generatorii de ^{132}I) şi unele gaze nobile ca ^{85}Kr şi ^{133}Xe.

2.3. RADIOIZOTOPI OBŢINUŢI ÎN ACCELERATOARELE DE PARTICULE ÎNCĂRCATE [5—8]

În prezent o serie de radioizotopi de viaţă scurtă şi ultrascurtă utilizaţi în cercetarea ştiinţifică şi mai ales în medicină şi biologie sînt obţinuţi în acceleratoarele de particule folosind cu preponderenţă reacţiile nucleare (p, n), $(p, 2n)$, (α, n), (α, pn), $(\alpha, 2n)$, (d, α), (d, n), $(d, 2n)$ sau cele cu ioni de heliu ^3He(^3He, p), (^3He, n), (^3He, α). Acceleratoarele de particule folosite în prezent pentru producţia curentă de radioizotopi sînt : ciclotronul şi acceleratorul Van de Graaff. În primul se accelerează de

Scanned with OKEN Scanner

obicei protoni, ^{1}H, deuteroni ^{2}H, tritoni ^{3}H, particule α (^{4}He), ioni ^{3}He sau uneori ioni grei (oxigen, carbon etc.,) la energii cuprinse între 10 și 50 MeV, iar în al doilea, ioni de heliu (^{3}He și ^{4}He) și alte particule încărcate la energii mai mici, 5—10 MeV. Pentru scopuri de cercetare și mai puțin de producție există tipuri de acceleratoare Van de Graaff cuplate în linie cîte 2 sau 3 acceleratoare denumite „Tandem" care sînt capabile să furnizeze ascicule de particule încărcate, la energii de 20—50 MeV.

Un rol important în reacțiile nucleare cu particule încărcate îl are bariera de potențial, care împiedică pătrunderea particulelor în nucleul-țintă. Se știe că, totuși, astfel de reacții au loc deși particulele incidente au energia mai mică decît bariera de potențial. Acest lucru se explică prin efectul de tunelare, care permite particulei încărcate să pătrundă în nucleu și să formeze cu acesta un nucleu compus. Penetrabilitatea barierei de potențial pentru particula încărcată depinde în mare măsură de raportul dintre înălțimea barierei de potențial și energia cinetică a particulei pe de o parte și de sarcina ei pe de altă parte.

Dintre reacțiile nucleare cu particule încărcate mai importante, folosite în acceleratoarele nucleare pentru producția de radioizotopi, cu aplicații în medicină menționăm următoarele: $^{23}Na(d, p)^{24}Na$; $^{58}Fe(d, p)^{59}Fe$, $^{66}Zn(d, n)^{67}Ga$, $^{24}Mg(d, \alpha)^{22}Na$, $^{56}Fe(d, n)^{57}Co$, $^{51}V(d, 2n)^{51}Cr$, $^{121}Sb(\alpha, 2n)^{123}I$; $^{111}Cd(d, 2n)^{111}In$, $^{16}O(^{3}He, p)^{18}F$.

O nouă posibilitate de mare perspectivă pentru producerea radioizotopilor într-o varietate mai mare decît se obține din produșii de fisiune ne-o oferă reacția nucleară de spalație. Prin termenul spalație se înțelege acea reacție nucleară cu particule încărcate (protoni) a căror energie cinetică este suficient de mare (> 50 MeV) și care bombardînd nucleul-țintă produc o ciocnire atît de intensă încît are loc o smulgere (ejectare) din acesta a mai multor nucleoni. Astfel, prin această reacție se obține o serie de noi radionuclizi care spre deosebire de reacția de fisiune, pot fi atît neutrono-deficitari cît și neutrono-excedentari. De exemplu, dacă din fisiune se obțin nuclee de staniu ce generează izotopi ai indiului cu exces de neutroni și cu mase cuprinse între 116—121, din reacția de spalație se pot obține în plus, afară de cei menționați, și radionuclizi ai indiului cu mase atomice sub 115 [9—12].

Alături de reacțiile nucleare în acceleratoarele nucleare cu particule încărcate pentru producerea radioizotopilor, în prezent, deși nu în mod curent, se mai folosesc și reacțiile cu fotoni în acceleratorul de electroni denumit betatron. În acest tip de acceleratoare se accelerează inițial electroni pînă la energii de cîteva zeci de MeV și apoi prin frînare, în plăci de wolfram sau alte metale cu puncte înalte de topire, produc radiații X de frînare (Bremsstrahlung) adică fotoni și care se deosebesc de reacțiile X obișnuite prin energia lor mare ce variază de la cîțiva MeV pînă la zeci de MeV. Spre deosebire de reacțiile (n, γ) și cele cu particule încărcate, se presupune că în cazul reacțiilor fotonucleare nu se formează nucleul compus. Energia de prag a fotonilor, adică acea energie la care pot avea loc reacții fotonucleare, variază în funcție de natura nucleelor țintă. Astfel, pentru nucleele ușoare de exemplu ^{12}C, ^{14}N, ea este de 18,7 MeV și, respectiv, de 10—12 MeV, iar în cazul nucleelor grele aceasta scade treptat, fiind de 9 MeV pentru elementele din mijlocul sistemului periodic și ajunge la 6 MeV pentru uraniu și toriu.

Radionuclizii formați ca rezultat al reacțiilor fotonucleare, datorită energiei de recul ce o posedă, sînt îndepărtați din matricea lor, găsindu-se

Scanned with OKEN Scanner

în forme chimice diferite față de cele ale elementelor-țintă, ceea ce uneori permite separarea lor prin metode radiochimice cu toate că în aceste reacții numărul atomic rămîne neschimbat.

2.4. FORMAREA ȘI ACUMULAREA RADIOIZOTOPILOR ÎN ȚINTELE IRADIATE CU NEUTRONI, PARTICULE ÎNCĂRCATE ȘI FOTONI

Activarea țintelor supuse iradierii cu neutroni, particule încărcate și fotoni are loc după legea exponențială și depinde de secțiunea eficace a nuclidului respectiv, de intensitatea fluxului de neutroni, particule sau fotoni și de timpul de iradiere. După un anumit timp de iradiere, acumularea radioactivității în țintă ajunge la saturație și cantitatea de radionuclid formată în unitatea de timp devine aproximativ egală cu cea care se dezintegrează în aceeași unitate de timp și orice mărire a timpului de iradiere practic nu mai duce la creșteri semnificative ale radioactivității.

Activitatea acumulată în țintă cînd se formează un singur radionuclid B conform reacției nucleare :

$$A(n, \gamma)B \xrightarrow{\lambda_B} C \text{ (stabil)}$$

se poate calcula cu ajutorul următoarelor formule :

A. Activare cu neutroni termici

$$\Lambda = \frac{N\Phi\sigma}{3{,}7 \cdot 10^7}\left[1 - e^{-\frac{0{,}693\, t}{T_{1/2}}}\right] \text{ mCi}, \qquad (2.3)$$

în care N este numărul de atomi ai nuclidului din țintă ce suferă reacția nucleară (n, γ) la care ne referim și care se poate determina cu ajutorul relației (2.3), Φ fluxul de neutroni termici din reactorul nuclear $n/cm^2 \cdot s$, σ secțiunea eficace a reacției (n, γ) pentru nuclidul respectiv, exprimată în barni $\times 10^{-24}$ cm^2, t timpul de iradiere exprimat în ani, luni, săptămîni, zile, ore, minute sau secunde, funcție de timpul de înjumătățire $T_{1/2}$ care trebuie să fie exprimat în aceeași unitate de timp, iar $3{,}7 \cdot 10^7$ reprezintă coeficientul de transformare dez/s în mCi (1 mCi = $3{,}7 \cdot 10^7$ dez/s).

Într-un reactor nuclear fluxul de neutroni pe lîngă componenta neutronilor termici mai conține și o altă componentă, cea a neutronilor epitermici sau de rezonanță, care la fel induce reacții nucleare. În acest caz ecuația (2.3) se scrie :

$$\Lambda = \Lambda_t + \Lambda_r = N(\Phi_t\sigma_0 + \Phi_r I_0)\left(1 - e^{-\frac{0{,}693\, t}{T_{1/2}}}\right) \text{ mCi}, \qquad (2.4)$$

unde I_0 reprezintă valoarea integralei de rezonanță [13—18].

Scanned with OKEN Scanner

B. Activare cu particule încărcate (p, d, α, ^{3}He, ioni grei)

$$A = \frac{In\sigma x}{3{,}7 \cdot 10^7}\left(1 - e^{-\frac{0{,}693\, t}{T_{1/2}}}\right) \text{ mCi}, \qquad (2.5)$$

în care I este intensitatea fluxului de particule/s, σ secţiunea eficace de activare, în barni $\times 10^{-24}$ cm^2, x grosimea ţintei (foiţei) supusă iradierii, în cm, n numărul de atomi pe cm^3 în ţintă ai nuclidului supus activării, t timpul de iradiere, iar $T_{1/2}$ timpul de înjumătăţire.

Spre deosebire de N din relaţia (2.3), în acest caz n se calculează astfel :

$$n = \frac{c\varkappa\mathcal{N}}{A} \text{ atomi/cm}^3, \qquad (2.6)$$

unde c este concentraţia nuclidului în ţintă (g/cm^3), $\varkappa$ abundenţa nuclidului în ţintă, $\mathcal{N}$ numărul lui Avogadro, iar A greutatea atomică a nuclidului respectiv.

Deoarece în practică intensitatea fasciculului de particule încărcate se măsoară în submultipli ai amperului, calculul activităţii se mai poate efectua şi cu ajutorul relaţiei :

$$A = 1{,}69 \cdot 10^5 \cdot I \cdot B\left(1 - e^{-\frac{0{,}693\, t}{T_{1/2}}}\right), \qquad (2.7)$$

în care I este intensitatea fasciculului în μA, iar B coeficientul de folosire a fasciculului de particule încărcate, care ţine seama atît de secţiunea eficace medie în cazul ţintelor groase cît şi de parcursul R al particulelor în ţintă [19—30].

C. Activare cu neutroni rapizi sau de fisiune

Neutronii rapizi sau de fisiune pot induce reacţii nucleare (altele decît (n, γ), de exemplu (n, p), (n, α) şi $(n, 2n)$. Prin intermediul acestor reacţii se obţin următorii radionuclizi mai frecvent utilizaţi :

$^{32}S(n, p)^{32}P$; $^{56}Fe(n, p)\,^{56}Mn$; $^{27}Al(n, \alpha)\,^{24}Na$; $^{35}Cl(n, \alpha)\,^{32}P$; $^{23}Na(n, 2n)^{22}Na$,

iar activitatea se calculează conform relaţiei (2.7) dar în care Φ este fluxul integrat al neutronilor, iar σ secţiunea eficace medie de fisiune.

2.5. RADIONUCLIZI OBŢINUŢI DIN GENERATORI DE IZOTOPI

Într-o serie de reacţii nucleare în care în final se formează mai mult de un radionuclid, se pot alege perechi de radionuclizi legaţi genetic, în care unul (radionuclidul-părinte) are $T_{1/2}$ mai mare, şi prin dezintegrarea lui generează un alt radionuclid (radionuclidul-fiică) cu $T_{1/2}$ mult mai mic. Acest sistem denumit generator de izotop permite introducerea pe scară largă în medicină a radionuclizilor de viaţă scurtă şi ultrascurtă, putînd fi transportaţi la distanţe mari de locul produ-

Scanned with OKEN Scanner

cerii lor, ceea ce în cazul livrării radionuclidului-fiică în formă separată de radionuclidul-părinte, nu ar avea sens datorită dezintegrării totale a acestuia în timpul transportului.

În prezent se cunosc peste 110 asemenea reacţii nucleare, ce pot fi scrise în forma generală :

$$A(n, \gamma)B \xrightarrow[\lambda_C > \lambda_B]{\lambda_B} C \xrightarrow{\lambda_C} D \text{ (stabil)} \qquad (2.8)$$

care permit formarea de perechi de radionuclizi B, C de tipul „generatori" [31—36]. Pentru ca un radionuclid C rezultat din astfel de generatori să poată fi aplicat ca trasor radioactiv în medicină, în scopuri diagnostice, acesta trebuie să posede anumite caracteristici nucleare (fizice) biologice şi chimice. Sub aspectul caracteristicilor nucleare radionuclidul respectiv trebuie să posede o radiaţie gamma monoenergetică cu o energie suficient de mare ca să poată fi uşor detectată şi colimată dar în acelaşi timp destul de mică, astfel că dozele de absorbţie la iradierea internă (în organul-ţintă) să fie cît se poate de reduse. De asemenea, se pune şi problema iradierii externe, pentru personalul care manipulează astfel de generatori, fapt ce determină grosimea ecranului de protecţie (containerului) în care este montat generatorul. O altă caracteristică nucleară importantă este timpul de înjumătăţire $T_{1/2}$ care poate varia de la minute la cîteva ore (a se vedea mai departe). Din punctul de vedere al caracteristicilor biologice, radionuclidul-fiică în concentraţii trasoare trebuie să nu fie toxic, pirogen şi să nu producă reacţii adverse (anafilactice etc.). Radionuclidul produs în generator, sau compuşii lui, trebuie să posede o afinitate selectivă de localizare într-un anumit organ, iar perioada biologică să fie suficient de mică. În ceea ce priveşte caracteristicile chimice, radionuclidul-fiică trebuie să posede forme chimice stabile şi care permit o separare a lui de radionuclidul-părinte prin procese fizico-chimice simple (eluţie, extracţie, distilare).

Acumularea radionuclizilor-fiice într-un astfel de sistem, ca urmare a dezintegrării radioactive a radionuclidului-părinte, se poate exprima prin ecuaţia de geneză (considerînd că se formează n radionuclizi-fiice) :

$$N_n = N_1 e^{-\lambda_1 t} + N_2 e^{-\lambda_2 t} + \ldots N_n e^{-\lambda_n t}, \qquad (2.9)$$

în care $N_1, N_2 \ldots N_n$ reprezintă numărul de atomi ai radionuclizilor respectivi formaţi prin dezintegrarea radionuclidului-părinte şi ale căror valori se determină cu ajutorul relaţiilor :

$$N_1 = N_1^0 \frac{\lambda_1 \lambda_2 \ldots \lambda_{n-1}}{(\lambda_2 - \lambda_1)(\lambda_3 - \lambda_1)\ldots(\lambda_n - \lambda_1)}, \qquad (2.10)$$

$$N_2 = N_1^0 \frac{\lambda_1 \lambda_2 \ldots \lambda_{n-1}}{(\lambda_1 - \lambda_2)(\lambda_3 - \lambda_2)\ldots(\lambda_n - \lambda_2)}, \qquad (2.11)$$

în care N_1^0 reprezintă numărul de atomi ai radionuclidului-părinte la momentul $t = 0$, iar $\lambda_1, \lambda_2 \ldots \lambda_{n-1}$ constantele radioactive ale radionuclizilor-fiice. Considerînd cazul cînd avem în sistem numai radionucli-

dul-părinte şi un singur radionuclid-fiică, ecuaţia (2.11) se simplifică şi N_2 se determină astfel :

$$N_2 = N_1^0(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}) \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1}. \tag{2.12}$$

Avînd în vedere că radionuclidul-părinte are timpul de înjumătăţire $T_{1/2}$ mai mare decît cel a radionuclidului-fiică, între vitezele de acumulare a ultimului şi cea de dezintegrare a primului după un anumit timp se stabileşte un „echilibru tranzient", moment la care raportul activităţilor celor doi radionuclizi devine constant, adică :

$$\lambda_1 N_1 = \lambda_2 N_2. \tag{2.13}$$

Deoarece în acest caz în ecuaţia (2.12) termenul din paranteză $e^{-\lambda_2 t}$ are o valoare neglijabilă faţă de $e^{-\lambda_1 t}$ atunci cînd timpul t este mare, N_2 devine :

$$N_2 = N_1^0 e^{-\lambda_1 t} \cdot \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1}. \tag{2.14}$$

Considerînd că :

$$N_1 = N_1^0 e^{-\lambda_1 t}$$

şi conform relaţiei (2.13) efectuînd operaţiile de înlocuire obţinem :

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1}. \tag{2.15}$$

Din relaţia (2.15) rezultă că activitatea radionuclidului-fiică va fi mereu mai mare decît cea a radionuclidului-părinte cu valoarea dată de factorul $\frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1}$, care atinge maximul după timpul t_{max}; după acest timp activitatea radionuclidului-fiică scade conform $T_{1/2}$ a radionuclidului-părinte. Pentru determinarea timpului maxim diferenţiem ecuaţia (2.12) şi considerăm că la valorile $t = t_{max}$, cînd această ecuaţie devine :

$$\frac{dN_2}{dt} = 0,$$

în final obţinem :

$$t_{max} = \frac{2{,}303}{\lambda_2 - \lambda_1} \log \frac{\lambda_2}{\lambda_1} = 3{,}324 \frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2} \log \frac{T_1}{T_2}, \tag{2.16}$$

unde T_1 şi T_2 reprezintă timpii de înjumătăţire respectivi.

Dintre perechile de radionuclizi generatori care în prezent au primit o largă utilizare în medicină menţionăm :

$^{99}Mo - ^{99m}Tc$, $^{113}Sn - ^{113m}In$, $^{87}Y - ^{87m}Sr$, $^{132}Te - ^{132}I$ şi $^{188}W - ^{188}Re$.

Scanned with OKEN Scanner

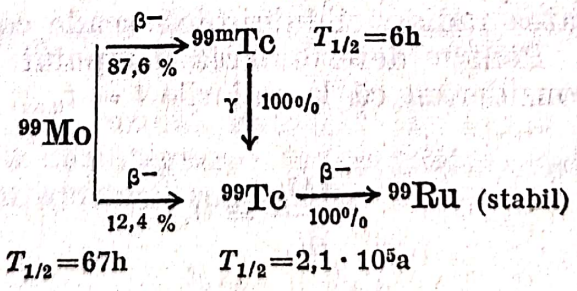
Un generator de radionuclizi constă, în general, dintr-o coloană de sticlă sau plexiglas de dimensiuni 1,5 × 4 cm — 2,5 × 6 cm umplută cu un material adsorbant (de obicei Al_2O_3 sau $ZrO_2 \cdot xH_2O$), uneori se folosesc şi alţi adsorbanţi, ca SiO_2 sau răşini schimbătoare de ioni de tipul Bio-Rad AGIX—10. Materialul adsorbant trebuie să fie insolubil în soluţii apoase de acizi şi baze sau săruri ale acestora la concentraţii mici şi medii, şi să permită sterilizarea lor pe cale termică sau cu radiaţii ionizante, fără a se degrada. Coloana este montată într-un container de plumb în poziţie verticală prevăzut cu orificii de intrare şi ieşire a soluţiilor necesare eluţiei generatorului, astfel încît să se asigure protecţia contra radiaţiilor radioactive emise de ambii radionuclizi părinte-fiică adsorbiţi pe coloană.

Eluatul trebuie să aibă o înaltă puritate radionuclidică, radiochimică şi chimică avînd o formă chimică ce permite o utilizare imediată. Eluţia generatorului se face la intervale de timp optim, în care acumularea radionuclidului-fiică în coloană atinge maximul (t_{max}) calculat conform relaţiei (2.16).

În cele ce urmează se descriu succint generatorii de radionuclizi cu utilizare frecventă în medicină.

2.5.1. GENERATORUL DE ^{99m}Tc [37—41]

Radionuclidul-părinte ^{99}Mo pentru acest generator se obţine fie prin iradierea cu neutroni (reacţie n, γ) a izotopului stabil ^{98}Mo care în amestecul natural de izotopi ai molibdenului se află în abundenţă de 24,4%, sau din produşii de fisiune ai ^{235}U din care se separă în formă de „fără purtător" de înaltă activitate. Reacţia (n, γ) de producere a ^{99}Mo este mai puţin rentabilă decît cea de fisiune, mai ales atunci cînd se folosesc ţinte îmbogăţite de ^{98}Mo în scopul obţinerii de activităţi specifice înalte. ^{99}Mo astfel obţinut trebuie să fie din punct de vedere radionuclidic foarte pur, adică să nu conţină nici o impuritate radioactivă peste limita admisă de 0,01%. Prin dezintegrarea ^{99}Mo se formează atît ^{99m}Tc cît şi ^{99}Tc (1 mCi ^{99m}Tc produce $3{,}3 \cdot 10^{-6}$ μCi ^{99}Tc), conform schemei:



După unii autori [41], ^{99m}Tc emite două radiaţii γ, una cu energia de 0,142 MeV (1,6%), iar alta de 0,140 MeV (98,4%) şi întrucît sînt foarte apropiate, practic se comportă ca o radiaţie monoenergetică. Aceste caracteristici nucleare menţionate mai sus determină ca ^{99m}Tc să fie unul dintre radionuclizii obţinuţi din generatorii de izotopi, cu cea mai largă utilizare în medicină pentru diagnostic cu ajutorul tehnicii scintigrafice. De asemenea, proprietăţile biologice şi acţiunea lui fiziologică converg spre acest scop potenţînd spectrul de aplicaţii medicale. La concentraţia extrem de mică a ^{99m}Tc în eluatul de la generatori (10 mCi ^{99m}Tc reprezintă

Scanned with OKEN Scanner

aproximativ 10^{-3} μg technețiu) din punct de vedere toxicologic pericolul pe care l-ar putea avea acesta în organism este extrem de redus. De asemenea, se presupune că în eluatul de technețiu s-ar putea găsi urme de molibden atît stabil cît și ^{99}Mo (a cărui concentrație limită permisă este 0,1% din activitatea totală a eluatului) dar care are o toxicitate redusă în comparație cu alți radionuclizi.

Doza letală a molibdenului sub formă de molibdat de sodiu administrat intraperitoneal la cobai este de 117 mg, Na_2MoO_4 per kg greutate corporală, iar DL_{50} pentru șoareci administrat i.v. este de 248 mg/kg. Perioada biologică pentru ^{99}Mo se estimează a fi de circa 20 de zile [41], 80% din cantitatea de ^{99}Mo fiind localizată în ficat.

Dintre impuritățile chimice în eluatul de ^{99m}Tc poate fi uneori întîlnit aluminiul în cantități foarte mici (din adsorbantul Al_2O_3 al coloanei), concentrația limită fiind de 0,5 mg/probă injectată. DL_{50} a $AlCl_3$ la administrarea i.v. la șoareci este de circa 79 mg/kg, echivalentă cu 20 mg Al.

2.5.2. GENERATORUL DE ^{113m}In [42—51]

Radionuclidul părinte ^{113}Sn pentru acest generator, se obține prin reacție (n, γ) iradiind cu neutroni termici ținte îmbogățite de ^{112}Sn conform schemei :

$$^{112}Sn \xrightarrow[T_{1/2}=118\ d,]{(n,\gamma)} {}^{113}Sn \xrightarrow{C.E.} {}^{113m}In \xrightarrow[T_{1/2}=1{,}66\ h.]{C.E.} {}^{113}In\ (stabil)$$

Prin dezintegrarea sa ^{113m}In emite o radiație γ cu energia de 0,392 MeV (monoenergetică) fapt ce reprezintă o caracteristică favorabilă efectuării de scintigrafii de calitate superioară, obținîndu-se o imagine clară a organului țintă, datorită penetrabilității mai bune a radiației γ de 0,392 MeV față de 0,140 MeV a ^{99m}Tc.

În ceea ce privește toxicitatea ^{113m}In în stare ionică în comparație cu alți radionuclizi, la concentrații ultratrasoare este mult mai mică fiind clasat în grupa a III-a, iar concentrația radioactivă maximă admisă în apă este de 10^{-2} Ci/m³. Luat ca metal, indiul este unul dintre cele mai toxice elemente, doza letală minimă este de 3 mg/kg pentru șoareci și de 15 mg/kg pentru cobai. ^{113m}In se administrează la om în doze de 2—4 mCi, iar aceasta calculată la conținutul de radionuclid ^{113m}In conține 0,3275—0,655 ng indiu, ceea ce este de $9{,}1 \cdot 10^6$ ori mai mică decît doza letală la șoareci.

Generatorul de ^{113m}In constă la fel ca cel al ^{99m}Tc, dintr-o coloană de sticlă sau plexiglas umplută cu oxid de zirconiu hidratat ($ZrO_2 \cdot xH_2O$) pe care se află adsorbit ^{113}Sn. Adsorbția staniului pe oxidul de zirconiu se face din soluții acidulate cu HCl în care staniul se află în formă de anion $^{113}SnCl_6^{2-}$. Eluția ^{113m}In de pe coloana generatorului se poate face de mai multe ori pe zi cu o soluție ~ 0,05 N HCl și o viteză de curgere de circa 0,5 ml/min, randamentul de eluție variind de la 75 la 85%, funcție de anumiți factori : natura și granulația adsorbantului, volumul și concentrația (pH-ul) eluantului (HCl), viteza de eluție etc. S-a observat că atunci cînd viteza de eluție crește, sau cînd eluantul este injectat în generator sub presiune mai mare ori concentrația acestuia este simțitor mai mare de 0,05 N HCl, crește de asemenea gradul de contaminare a eluatului

Scanned with OKEN Scanner

de clorură de indiu cu ^{113}Sn, a cărui concentrație maximă admisă este 0,2 μCi/mCi ^{113m}In sau 0,03% din activitatea totală a eluatului.

Astfel de condiții nefavorabile de eluție de asemenea duc la contaminarea eluatului și cu zirconiu care, la rîndul său este de nedorit, fiind și el toxic. Limita admisă a concentrației de zirconiu în eluat este de 5 μg/ml, iar o concentrație mai mare de 20 μg/ml a acestuia în eluatul administrat i.v. la iepuri duce la paralizia trenului posterior.

După o eluție generatorul trebuie lăsat anumit timp pentru regenerare, adică pentru acumularea activității ^{113m}In conform relației (2.12). Rezolvînd această relație funcție de t, s-a determinat timpul optim de acumulare a ^{113m}In în coloană, între două eluții, care este socotit a fi de 11,5 ore, moment la care activitatea ^{113m}In atinge maximul. Eluția generatorului se poate face și mai devreme de acest timp, dar în acest caz activitatea regenerată a ^{113m}In este mai mică, ca de exemplu :

t_{reg}	$T_{1/2} = 1{,}66$ h	$2\,T_{1/2} = 3{,}3$ h	$3{,}3\,T_{1/2} = 4{,}4$ h	$6{,}6\,T_{1/2} = 11$ h
2	50%	75%	90%	99%

De asemenea, s-a observat din practica de utilizare a generatorului de ^{113m}In că atunci cînd generatorii sînt noi și încă neutilizați, contaminarea eluatului cu ^{113}Sn este mai mare în prima lună de utilizare fiind de 10^{-4} — 10^{-3} și după circa 20 de eluții aceasta scade la 10^{-5} sau judecînd după raportul activităților celor doi radionuclizi $\frac{\text{Ci } ^{113}Sn}{\text{mCi } ^{113m}In}$ este 0,22 în prima lună și apoi eluînd zilnic generatorul acest raport ajunge la valoarea 0,03 menținîndu-se constant [43, 44, 45].

În ceea ce privește compoziția eluatului (0,05N HCl) acesta înglobează mai multe specii cationice sau neutre ce conțin ^{113m}In în următoarea proporție [46] :

$^{113m}In(H_2O)_6^{3+} = 5{,}85\%$, $^{113m}In(H_2O)_4Cl_2^{+} = 11{,}65\%$,

$^{113m}In(H_2O)_5Cl^{2+} = 80{,}50\%$, $^{113m}In(H_2O)_3Cl_3^{0} = 2{,}0\%$.

Funcție de natura complexantului (produsul farmaceutic) aceste specii pot avea o reactivitate selectivă mai mare sau mai mică, fapt ce determină înglobarea lor în acest produs în măsură mai mare sau mai mică, condiționînd astfel puritatea radiochimică a produsului radiofarmaceutic.

Prepararea unor generatori de radioizotopi ca ^{68}Ga, ^{87m}Sr, ^{137m}Ba etc. mai rar întîlniți în practica medicală curentă este descrisă în lucrările [52—59].

2.5.3. TENDINȚE ȘI PERSPECTIVE

Experiența acumulată pînă în prezent privind utilizarea produselor radiofarmaceutice obținute din radioizotopi de la generatorii de izotopi, arată că tendința de dezvoltare a acestora marchează următoarele probleme [60, 61] :

1) Producerea de generatori de izotopi radioactivi cu $T_{1/2}$ ultrascurt de ordinul 0,2—5 min, pentru studiul debitului şi funcţiei cardiace şi pentru diagnostic, prin scintigrafie precum şi cu $T_{1/2}$ scurt, de ordinul 20 — 60 min, pentru studii fiziologice. Introducerea în uz medical a radiofarmaceuticelor ce conţin radioizotopi cu $T_{1/2}$ scurt şi ultrascurt permite realizarea dezideratului unanim cerut şi acceptat de reducere la minimum posibil a dozei de iradiere a organului critic (ţintă) şi, în general, a organismului. Pentru comparare arătăm că administrarea unui mCi de ^{99m}Tc pentru studiul tiroidei produce o doză de iradiere de 100 mrad, pe cînd 1 mCi de ^{131}I produce o doză pentru acelaşi organ de 2000 mrad. La fel, înlocuirea ^{198}Au cu ^{99m}Tc reduce doza de 10 ori. Majoritatea radionuclizilor-părinte ai acestor generatori sînt obţinuţi la ciclotron, de aceea în viitor trebuie să i se acorde mai multă atenţie problemei respective precum şi instalării de ciclotroane în spitale pentru producerea „in House" a radiofarmaceuticelor cu radionuclizi de viaţă ultrascurtă sub formă de completuri (Kit).

Dintre generatorii de radionuclizi cu $T_{1/2}$ ultrascurt şi scurt cu perspective de utilizare în medicina nucleară afară de cei existenţi în prezent, ca ^{99}Mo—^{99m}Tc, ^{113}Sn—^{113m}In, menţionăm următorii :

Părinte	Fiică
$T_{1/2}$ *ultrascurt*	
^{81}Rb ($T_{1/2}$ = 4,6 h)	$\longrightarrow$ ^{81m}Kr ($T_{1/2}$ = 13s)
^{77}Br ($T_{1/2}$ = 56 h)	$\longrightarrow$ ^{77m}Se ($T_{1/2}$ = 18s)
^{82}Sr ($T_{1/2}$ = 25 zile)	$\longrightarrow$ ^{82}Rb ($T_{1/2}$ = 80s)
^{137}Cs ($T_{1/2}$ = 30 a)	$\longrightarrow$ ^{137m}Ba ($T_{1/2}$ = 153s)
^{122}Xe ($T_{1/2}$ = 20 h)	$\longrightarrow$ ^{122}I ($T_{1/2}$ = 3,6 min)
$T_{1/2}$ *scurt*	
^{103}Pd ($T_{1/2}$ = 17,5 zile)	$\longrightarrow$ ^{103m}Rh ($T_{1/2}$ = 57 min)
^{68}Ge ($T_{1/2}$ = 287 zile)	$\longrightarrow$ ^{68}Ga ($T_{1/2}$ = 68,2 min) etc.

2) Utilizarea în medicină a radionuclizilor de viaţă ultrascurtă şi scurtă pentru diagnostic prin scintigrafie impune creşterea rezoluţiei instalaţiilor de scintigrafie în scopul îmbunătăţirii imaginii scintigrafice prin perfecţionarea tipurilor de instalaţii existente sau elaborarea de tipuri noi.

2.6. METODE DE SEPARARE ŞI PURIFICARE A RADIOIZOTOPILOR [62—67]

După iradierea ţintelor cu neutroni în reactoarele nucleare sau cu particule încărcate şi fotoni în acceleratoarele de particule, acestea suferă o procesare chimică pentru separarea radionuclidului interesat şi, în final, purificarea lui de alte impurităţi radioactive. Metodele de separare mai frecvent folosite în acest scop sînt : solubilizarea, distilarea, precipitarea şi coprecipitarea, cromatografia de adsorbţie şi schimb ionic şi extracţia cu solvenţi.

Scanned with OKEN Scanner

2.6.1. SOLUBILIZAREA

Separarea radionuclidului de masa ţintei prin solubilizarea lui în diferite medii (soluţii organice sau apoase) prezintă simplitate în lucru dar are o utilizare foarte limitată la numai cîteva cazuri, datorită selectivităţii şi a randamentelor de separare reduse. Aşa cum s-a arătat mai sus, radionuclizii se obţin prin diferite reacţii : (n, γ), (n, p), (n, α) (p, n) (α, n) etc., astfel că aceştia pot fi izotopi ai aceluiaşi element din care este constituită ţinta, cazul reacţiei (n, γ), sau pot fi cu numere atomice diferite de ale elementelor ţintei. În primul caz metoda solubilizării nu este eficace pe cînd în cazul celorlalte reacţii nucleare aceasta poate fi utilizată. Astfel, separarea sodiului radioactiv din ţinta de oxid de magneziu după bombardarea ei cu deuteroni se poate face prin metoda solubilizării.

2.6.2. DISTILAREA

Metoda distilării este des utilizată în practica de laborator şi producţia unor radionuclizi care prezintă proprietăţi fizico-chimice adecvate acestui scop, avînd puncte de fierbere sub 100°C şi fiind volatile. Prin această metodă se separă iodul radioactiv din ţinta de oxid de telur, bromul şi iodul din produşii de fisiune sau tritiul din ţinta de litiu. Pentru antrenarea şi scoaterea în măsură cît mai mare a radionuclidului din ţintă uneori se folosesc „purtători" care pot fi izotopi stabili din acelaşi amestec natural de izotopi ai elementului respectiv ca şi radionuclidul (izotopul radioactiv) sau jeturi de gaze inerte. Toate aceste operaţii se efectuează în instalaţii ermetizate şi special amenajate în nişe şi boxe cu protecţie contra radiaţiilor.

2.6.3. PRECIPITAREA ŞI COPRECIPITAREA

Separarea unui radionuclid de alţi radionuclizi şi elemente stabile adeseori se face cu ajutorul metodei de precipitare sau coprecipitare cu purtători izotopici, izomorfi sau inerţi.

Coprecipitarea cu purtători izotopici se numeşte acea operaţie de precipitare a unui radionuclid din soluţie la concentraţii extrem de mici prin antrenarea lui cu un izotop stabil al elementului din al cărui amestec izotopic face parte radionuclidul respectiv. Forma chimică a purtătorului izotopic trebuie să fie aceeaşi ca cea a radionuclidului supus coprecipitării. Cantitatea de purtător introdusă în sistem depinde în primul rînd de produsul de solubilitate al compusului radioactiv coprecipitat. Această variantă a metodei de coprecipitare nu permite obţinerea de produse radioactive cu activitate specifică mare [68 — 71].

2.6.4. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ

Metoda cromatografică este una dintre metodele de separare cele mai larg răspîndite în practica de laborator şi de producţie a radioizotopilor. Funcţie de mecanismul de adsorbţie sau absorbţie şi de natura adsorbantului această metodă comportă două variante : cromatografia de adsorbţie şi

Scanned with OKEN Scanner

cromatografia de schimb ionic. În cromatografia de adsorbție [72, 73] procesul primar îl constituie adsorbția moleculară sau ionică. În calitate de adsorbant, în majoritatea cazurilor se folosește oxidul de aluminiu prelucrat chimic în diferite forme (bazic, neutru și acid). Separarea are loc pe coloane de lungimi diferite umplute cu Al_2O_3 prin care se trece soluția ce conține amestecul de radionuclizi și care, funcție de afinitatea lor de adsorbție, se vor adsorbi fie în straturile superioare ale coloanei, fie în straturile următoare, formînd zone de adsorbție. La concentrații chimice cu purtător izotopic, aceste zone se pot distinge între ele prin culoarea lor diferită. Radionuclizii adsorbiți pe coloană se separă prin spălarea acesteia cu soluții ce conțin fie ioni ai unui element (nuclid) neradioactiv ce au o afinitate mai mare de adsorbție decît radionuclidul urmărit (cromatografie de substituție), fie un acid, bază sau agent complexant (cromatografia de eluție) ce permite o separare selectivă, sau numai un solvent (electrolit) comun tuturor radionuclizilor adsorbiți și care prin introducerea lui continuă în coloană prin partea superioară produce o deplasare a zonelor de adsorbție spre partea inferioară (metoda frontală), iar radionuclidul din zona respectivă, trece astfel în efluent (filtrat).

Cromatografia gazoasă [74, 75] de asemenea se consideră a fi un mijloc eficient de separare a radionuclizilor încorporați în diferiți compuși marcați, îndeosebi organici.

Schimbul ionic în ultimele două decenii a primit o largă utilizare ca metodă eficientă de concentrare, separare și purificare a radionuclizilor. În calitate de adsorbanți se folosesc rășini schimbătoare de ioni, cationiți și anioniți, cu capacități de adsorbție (schimb) mult mai mari decît schimbătorii de ioni de tip mineral (anorganici). Proprietățile fizico-chimice și metodele de obținere a rășinilor schimbătoare de ioni se descriu în lucrările [76, 77, 83).

Gradul de separare prin metoda schimbului ionic a doi ioni aflați în soluție se exprimă prin coeficientul de separare

$$Y = \frac{\varphi_1}{\varphi_2}, \tag{2.17}$$

în care φ_1 și φ_2 reprezintă coeficienții de distribuție ai ionilor respectivi în cele două faze (soluție și cationit). În practica măsurătorilor cu radioizotopi coeficientul de distribuție se determină cu ajutorul relației :

$$\varphi = \frac{I_0 - I}{I} \frac{V}{m}, \tag{2.18}$$

unde I_0 și I exprimă numărul de impulsuri pe unitatea de volum a soluției radioactive înainte de efectuarea reacției de schimb ionic, și respectiv după aceasta, V volumul soluției, iar m greutatea rășinii schimbătoare de ioni luată pentru experiență. Tehnica de lucru pentru separarea radionuclizilor prin metoda schimbului ionic este descrisă în lucrările [76 — 83].

2.6.5. EXTRACȚIA CU SOLVENȚI

Metoda extracției cu solvenți se aplică în separarea unui mare număr de radionuclizi, întrucît oferă posibilități largi în alegerea sistemelor de solvenți și este simplă în realizarea ei practică. Principiul acestei metode constă în distribuția uneia sau mai multor substanțe între două

faze lichide nemiscibile, de obicei una apoasă şi alta organică (solvent). Această distribuţie comportă un aspect chimic complex datorită multitudinii de procese sau reacţii ce pot avea loc în sistemul bifazic multicomponent. Astfel, distribuţia unei substanţe sau unui ion poate avea loc datorită unei simple solvatări, unei reacţii de complexare sau unei reacţii specifice.

Schematic, procesul de extracţie a unui ion M^{m+} din soluţia apoasă de către un solvent organic HA este descris de ecuaţia :

$$M_{aq}^{m+} + mHA_{org} \rightleftarrows MA_{m(org)} + mH_{aq}^{+} \qquad (2.19)$$

iar coeficientul de distribuţie se scrie :

$$\varphi = \frac{MA_m(org)}{M_{aq}^{m+}} \qquad (2.20)$$

În realitate procesul de extracţie cu solvenţi este mult mai complex decît este redat de ecuaţia (2.19) deoarece intervin o serie de factori mai ales în cazul extracţiei prin complexare sau reacţii cu reactivi specifici. Pentru o completă documentare se recomandă lucrările [6, 62, 64, 84, 86].

Folosind tehnica cu trasori radioactivi coeficientul de distribuţie se poate determina în mod similar cu cel în cazul schimbului ionic (vezi rel. (2.18)).

BIBLIOGRAFIE

1. E. Fermi, „Nuclear Physics", Izd. inostranoi literatury, Moskva, 1951.
2. E. Segré, „Experimental Nuclear Physics", vol. II, Part. VI, New York — London, 1953.
3. R.S. Maddock, W. Wayne Meinke, *Radiochemical Separations*, Progress Report 11 Dept. Chemistry, Univ. Michigan, Ann Arbor, 1962.
4. J. Perdijon, „L'Analyse par Activation, Masson et Cie, cap. I, Paris, 1967.
5. I. Gălăţeanu, „Radiochimia aplicată", Cap. 5, Edit. Academiei, Bucureşti, 1976.
6. A.N. Murin, V.D. Nefedov, V.P. Svedov, „Radiokhimiya i khimia iadernyh protsesov", Gos. Naucino-tehnicescoe izd. khim. literatury, cap. 12 şi 18, Leningrad, 1960.
7. Génie Atomique, tome 4, vol. 2, Les Materiaux Nucléaires, Institut National Des Sciences et Techniques Nucléaires, Saclay, France, 1961.
8. Y. Cohen, „Radionuclides in Pharmacology", vol. I. cap. 2 şi 3, Pergamon Press, Oxford—New York, 1971.
9. M. Rich, M. Madey, *USAEC Report* UCRL-2301, March, 1954.
10. A.A. Caretto, Jr., *USAEC Report* NYO-10693, July, 1964.
11. G. Rudstam, *Naturforschung*, **21**, A(7), 1027 (1966).
12. L.G. Stang Jr., M. Hillman, E. Lebowitz, *Isotopes and Radiation Technology*, **8**, 1 (1970).
13. M.K. Drake, *Nucleonics*, **24**, 108 (1966).
14. W.S. Lyon Jr., „Guide to Activation Analysis", D. Van Nostrand, Princeton, N.Y. U.S.A., 1964.
15. R.S. Rochlin, *Nucleonics*, **17**, 54 (1959).
16. C.H. Hogg, L.D. Weber, Proc. Symposium on „Radiation Effects on Metals and Neutron Dosimetry", Los Angeles, ASTM Special Technical Publication, nr. 341, 133, Philadelphia, Penn. U.S.A., 1963.
17. P.S. Baker, A.F. Rupp et al., *Isotopes Radiation Technnology*, **1**, 143, 155 (1963).
18. P.S. Baker, „Radioactive Pharmaceuticals", Proc. Symp. Oak Ridge, Tenn. U.S.A., p. 129—139, UAEC, Conf. 651111, 1966.
19. P.S. Baker, F.R. Duncan, L.O. Love, *Nucl. Sci. Eng.*, **7**, 325 (1960).
20. A.Y. Allen, B .L. Cohen, *Isotopes Radiation Technology*, **3**, 85 (1965).

Scanned with OKEN Scanner

21. F.N. Case, „Radioisotopes Procedures Manual" ORNL-3633, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn. U.S.A., 1964.
22. E.H. Graul, „Fortschritte der angewandten Radioisotopie und Grenzgebiete", 1 A, Hutig, Verlag, Heidelberg, 1957.
23. L.G. Stang, BNL-864, U.S.A., 1964.
24. J.B. Wilson (editor), „The Radiochemical Manual", 2nd edn. Radiochemical Centre, Amersham, England, 1966.
25. J.L. Servian, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **26**, 763 (1975).
26. I.J. Gruverman, P. Kruger, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **5**, 21 (1959).
27. J.A. Martin, R.S. Livingston, R.L. Murray, M. Rankin, *Nucleonics*, **13**, 28 (1955).
28. J.J. Pinajian, în (18), p. 143.
29. J.J. Pinajian, T.A. Butler, *Isotopes Radiation Technology*, **1**, 136, 155 (1963).
30. M.M. Ter-Pogossian, H.N. Wagner Jr., *Nucleonics*, **24**, 50, 62 (1966).
31. W.E. Winsche, L.G. Stang, Jr., W.D. Tucker, *Nucleonics*, **8**, 14, 94 (1951).
32. L.G. Stang, Jr., W.D. Tucker et al., „Proc. First UNESCO, Int. Conf. on Radioisotopes in Scientific Research", Pergamon Press, Paris, vol. 1, 50 (1957).
33. M.W. Green, R.F. Doering, M. Hillman, *Isotopes Radiation Technology*, **1**, 152 (1963).
34. P. Richards, în [18], p. 155—163.
35. M. Brucer, *Isotopes Radiation Technology*, **3**, 1 (1965).
36. M. Brucer, *Vignettes in Nuclear Medicine*, nr. 3, St. Louis, Miss. U.S.A., 1966.
37. P. Richards, *The Technetium — 99m Generator* BNL Report No. 9601 (1965).
38. P.V. Harper et al., *Nucleonics*, **22**, 50 (1964).
39. P.V. Harper et al., „Proc. Second IAEA Symp. on Medical Radioisotope Scanning", Athens, Greece, April 20—24, *2*, p. 33—45; IAEA, Vienna, 1965.
40. P. V. Harper, K.A. Lathrop, G. Andres, R. McCardle, A. Goodman, J. Covell, „Sixth Int. Symp. on Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research", Badgastein, Austria, 1964; *Radioaktive Isotope Klinik Forschung*, **6**, 136 (1965).
41. Squibb, Prospect for ^{99m}Tc-generator, New Brunswick, New Jersy, 1970.
42. Subramanian, J.G. McAfee, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **18**, 215 (1967).
43. CEN Saclay, Department des radioéléments Gif-sur-Yvette (France), comunicare personală, (1972).
44. I. Gălăţeanu, I. Zamfir, V.V. Lungu, *Generatorul de indiu — 113m*, Preprint I.F.A., RF—1—1974, Bucureşti (1974).
45. R.J. Rousselin, Cl. Gauthier, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **21**, 599 (1970).
46. P. Penkoske, E.Y. Potchen et al., *J. Nucl. Medicine*, **10**, 646 (1969).
47. I. Gălăţeanu, M. Roman, C. Uncuţa, I. Zamfir, C. Bratu, „Analytical methods for determination of radiochemical and radionuclidic purity of radiopharmaceuticals containing ^{99m}Tc and ^{113m}In", IAEA Research Contract No. 980/RB, Final Report, IAEA, Vienna, 1974.
48. H.S. Stern, D.A. Goodwin et al., *Nucleonics*, **24**, 57 (1966).
49. H.S. Stern, D.A. Goodwin et al., *Nucleonics*, **25**, 62—65 (1967).
50. D.A. Goodwin. H.S. Stern et al., *Nucleonics*, **24**, 65—68 (1966).
51. P.F. Castronovo, H.S. Stern, *Nucleonics*, **25**, 64—65 (1967).
52. J.F. Allen, J.J. Pinajian, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **16**, 319 (1965).
53. M. Hilman, M.W. Greene, W.N. Bishop, P. Richards, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **17**, 9 (1966).
54. Duphar Isotope Information, Iso-tips No. 20 (1969).
55. G.I. Gleason, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **8**, 90 (1960).
56. M.W. Green, W.D. Tucker, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **12**, 62 (1961).
57. Y. Yano, H.O. Anger, *J. Nucl. Med.*, **5**, 484 (1964).
58. R.L. Hayes, J.E. Carlton, B.L. Byrd, *J. Nucl. Med.*, **6**, 605 (1965).
59. M. Blau, R.R. Zielinski, M.A. Bender, *Nucleonics*, **24**, 60 (1966).
60. I. Gălăţeanu, A.T. Balaban, *Progresele ştiinţei*, **9**, no. 10 (1973).
61. IAEA-Report of a Consultants Meeting „Chemistry and Biochemistry of Radiopharmaceuticals", 15—17 Decemb. 1975, IAEA, Vienna, 1976.
62. S.E. Bresler, „Radioaktivnye elementy", cap. 3, Gos. Izd. Tehniko-teoreticeskoi literatury, Moskva, 1957.
63. A.I. Brodskii, „Khimiya Izotopov", cap. 5, Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskva, 1957.
64. An. N. Nesmeyanov, „Radiokhimiya", cap. 8, Izd. Khimiya, Moskva, 1972.
65. IAEA, „Proc. Seminar on Production and Use of Shortlived Radioisotopes from Reactors", vol. I şi II, Vienna, 5—9, November 1962, Vienna, IAEA, 1963.
66. IAEA, „Proc. Symposium on „Radiochemical Methods of Analysis", Salzburg, 19—23 octombrie 1964, vol. I şi II, IAEA, Vienna, 1965.
67. USAEC, NAS-NS-3101, Oak Ridge National Laboratory Tennesse, 1960—1962.
68. V.G. Hlopin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **A**, 101 (1924).

Scanned with OKEN Scanner

69. V.G. Hlopin, Z., *Anorg. Chem.*, **143**, 97 (1925).
70. V.G. Hlopin, *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **71**, 901 (1950).
71. O. Hahn, *Nature*, **49**, 961 (1929).
72. L. Zechmeister, L. Cholnsky, „Principles and Practice of Chromatography", Chapman and Hall Ltd., London, 1950.
73. L. Zechmeister, „Progress in Chromatography 1938—1947", Chapman and Hall Ltd., 1953.
74. O. Piringer, E. Tătaru, M. Paşcalău, *J. Gas. Chromat.*, **2**, 104 (1964).
75. G. Văsaru, „Les Isotopes stables", CEA-BIB-136, 1970.
76. Otdelenie Khimiceskyh Nauk AN SSSR, „Isledovannya v oblasti ionoobmennoi hromatografii", Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskva, 1957.
77. F.C. Nachod, „Ion Exchange, Theory and Application", Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer, New York, 1949.
78. V.V. Bocikarev, „Polucenie i primenenie radioaktivnyh izotopov", Gos. Izd. Literatury v oblasti nauki i tehniki, Moskva, 1962.
79. P.B. Orr, *Isotopes Radiat. Technology*, **2**, 16 (1964).
80. L. G. Stang Jr., BNL-Report 864 (T—347), August 1964.
81. Oak Ridge National Laboratory, TID—7015, Sections 1, 2, 3, 5, and 9, Supplements 1—8, 1964.
82. W.P. Grove, *Chem. Ind.*, 128 (1965).
83. C. Sabău, „Schimbul ionic. Teoria şi aplicaţiile sale în chimia analitică", Edit. Academiei, Bucureşti, 1967.
84. V.V. Fomin, „Khimia ekstraktsionyh protsesov", Atomizdat, Moskva, 1960.
85. F.L. Moore, Report NAS-NS-3101, 1960.
86. J.C. White, W.J. Roos, Report NAS-NS-3102, 1961.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

COMPUȘI MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI

3.1. MARCAREA IZOTOPICĂ

3.1.1. INTRODUCERE

O substanţă chimică, a cărei compoziţie (abundenţă) izotopică pentru fiecare element pe care îl conţine, este cea naturală, se numeşte nemarcată izotopic. Dacă compoziţia izotopică a unui element este modificată, atunci substanţa se numeşte marcată izotopic cu acest element; dacă este vorba doar de modificarea proporţiei nuclizilor stabili ai elementului, marcajul va fi denumit marcaj stabilonuclidic; dacă pe lîngă, sau în locul, nuclizilor stabili ai unui element apar nuclizi radioactivi, neexistenţi în natură în proporţia în care apar în substanţă, atunci marcajul este denumit radionuclidic, radioizotopic sau radioactiv.

Astfel, de exemplu, carbonul elementar care conţine 98,89 % ^{12}C şi 1,11 % ^{13}C nu este marcat izotopic. Dacă conţine mai mult ^{13}C decît 1,11 %, atunci avem carbon marcat cu ^{13}C (sau îmbogăţit în ^{13}C); dacă conţine mai puţin ^{13}C decît 1,11 % atunci avem carbon marcat cu ^{12}C (sau îmbogăţit în ^{12}C, sau sărăcit în ^{13}C); ambele aceste marcaje izotopice sînt marcaje stabilonuclidice. Dacă în proba de carbon apare ^{14}C (care nu este un radionuclid primordial fiindcă are un timp de înjumătăţire de numai 5736 ani), sau ^{11}C cu $T_{1/2} = 20$ min, atunci acea probă este marcată radioactiv.

Aşa cum s-a arătat în § 1.2.5, prin acţiunea radiaţiei cosmice se formează continuu în atmosferă o mică proporţie de ^{14}C din reacţia $^{14}N(n, p)^{14}C$, astfel că toate substanţele de origine biologică de dată relativ recentă (sub 10^5 ani) au o slabă radioactivitate şi, în principiu, sînt marcate radioactiv.

Pînă la mijlocul secolului trecut, majoritatea materialelor organice pe care le folosea omul fiind de origine biologică recentă, erau deci marcate radioactiv, în timp ce în zilele noastre prin industria chimică de sinteză care se dezvoltă din ce în ce mai mult pe baza rezervelor fosile de cărbune, petrol şi metan (complet neradioactive), majoritatea produselor organice care ne înconjură sînt, în mod paradoxal, mai puţin radioactive decît acum 100 de ani!

De obicei marcajul stabilonuclidic afectează o fracţiune substanţială din proporţia nuclizilor stabili (de ordinul procentului sau zecilor de procente), în timp ce marcajul radionuclidic adaugă, cu puţine excepţii, de ex. ^{14}C, la nuclizii stabili o fracţiune infimă de nuclizi radioactivi. Acest fel de marcaj radionuclidic se numeşte „cu purtător", dat fiind că nuclizii stabili „poartă" cu ei micile cantităţi de radionuclizi care, altfel,

Scanned with OKEN Scanner

s-ar pierde sub formă de radiocoloizi, prin adsorbţie pe vasele în care sînt manipulaţi. Mai rar se foloseşte marcajul radionuclidic „fără purtător" unde practic toţi atomii elementului dat sînt radioactivi (în acest caz se atinge activitatea specifică maximă după formula care va fi arătată mai departe în § 3.2.3. şi în tabela 3.2.

3.1.2. IZOMERIA IZOTOPICĂ; MARCAJ LABIL ŞI STABIL

Este cunoscut fenomenul de izomerie în chimie : moleculele compuse din aceiaşi atomi, legaţi prin legături covalente în moduri diferite, duc la substanţe izomere, de ex. etanolul H_3C-CH_2-OH şi dimetil-eterul $H_3C-O-CH_3$. Marcajul izotopic duce la apariţia unui nou tip de izomerie, denumit izomerie izotopică [1] : moleculele care au cel puţin doi atomi ai aceluiaşi element în poziţii neechivalente pot da naştere la izomeri izotopici. Astfel, dimetil-eterul marcat fie cu izotopi ai hidrogenului, fie ai carbonului, dă doar un singur izomer izotopic, căci deşi există mai mulţi atomi de carbon şi hidrogen în moleculă, ei sînt echivalenţi. Dar alcoolul etilic marcat cu un izotop al carbonului *C (care poate fi radioactiv, ^{14}C ori ^{11}C, sau stabil, ^{12}C ori ^{13}C) duce la doi izomeri izotopici $H_3{}^*C-CH_2OH$ (etanol-2-*C) şi $H_3C-{}^*CH_2OH$ (etanol-1-*C). Analog, la marcajul etanolului cu un izotop stabil ori radioactiv al hidrogenului *H, rezultă trei izomeri izotopici :

$$H_2C(^*H)-CH_2-OH, \quad H_3C-CH(^*H)-OH \quad \text{şi} \quad H_3C-CH_2-O(^*H)$$

Ultimul din aceşti izomeri izotopici se formează prin simpla amestecare cu apă $^*H_2O$ căci are loc schimbul izotopic instantaneu între grupele OH din alcool şi apă ; de aceea, acest marcaj se numeşte marcaj labil şi este neinteresant, căci se pierde la fel de repede în apă obişnuită H_2O. Marcajul la legăturile C—H se numeşte marcaj stabil şi se realizează prin sinteză. Tot prin sinteză se realizează marcajul cu carbon, care este totdeauna un marcaj stabil.

3.1.3. MARCAJUL IZOTOPIC MULTIPLU

În cele de mai sus s-a analizat cazul cînd se marchează o singură poziţie din moleculă eu un singur nuclid. Se cer analizate şi celelalte posibilităţi [2] : marcajul cu un singur nuclid la mai multe poziţii din aceeaşi moleculă duce la o moleculă multimarcată (di-marcată la $CH_2(^*H)-CH(^*H)-OH$, $^*CH_3-{}^*CH_2-OH$) ; (pentru a sublinia că este vorba de un singur nuclid, se poate folosi termenul de marcare simplă) ; marcajul unei poziţii din moleculă cu mai mulţi nuclizi ai aceluiaşi element, sau ai unor elemente diferite, duce la o moleculă multiplu marcată (de ex. dublu marcată la DCH_2-O-CH_2T sau $^{14}CH_3-O-CH_2D$; marcajul cu mai mulţi nuclizi în mai multe poziţii duce la o multimarcare multiplă (de ex.

Scanned with OKEN Scanner

etanol triplu di-marcat cu doi nuclizi ai hidrogenului și unul al carbonului $^{13}CH_2-CH-OH$ la ambele poziții stabile :

$$\begin{matrix} | & | \\ T & D \end{matrix}$$

După cum se vede ușor, numărul de izomeri izotopici la moleculele multimarcate și/sau multiplu marcate izotopic este mai mare decît la cele monomarcate și/sau simplu marcate izotopic : de ex. deși dimetil-eterul monomarcat simplu cu deuteriu nu are decît un singur izomer izotopic $CH_2D-O-CH_3$, dimetil-eterul dimarcat simplu cu deuteriu are doi izomeri izotopici : DCH_2-O-CH_2D și $D_2CH-O-CH_3$.

Bineînțeles, nomenclatura acestor situații complicate este și ea complicată, dar iese din cadrul cărții de față [3, 4].

3.1.4. MARCAJUL IZOTOPIC INTRINSEC ȘI EXTRINSEC

Dat fiind că proprietățile chimice ale izotopilor aceluiași element sînt practic identice, marcajul izotopic nu modifică substanțial proprietățile substanței marcate, dar permite să identificăm atomul și molecula astfel marcată din amestecul cu altele nemarcate. Acest fapt, împreună cu detectarea de la distanță, și chiar din interiorul organismului uman, a radiațiilor γ emise de radionuclizi, stau la baza folosirii izotopilor în medicină și a dezvoltării produselor radiofarmaceutice.

În cele de mai sus, marcajul a fost definit ca modificarea compoziției izotopice naturale a unui element prin nuclizi stabili sau radioactivi ai aceluiași element : un astfel de marcaj se numește marcajul izotopic intrinsec. S-au utilizat și denumirile, mai puțin potrivite, de marcaj izotopic veritabil, perfect, sau intern [5, 6]. Marcarea stabilonuclidică este întotdeauna intrinsecă. Se poate renunța la cuvîntul „intrinsec" uneori, cînd contextul evită confuziile.

Printr-o extensie de limbaj nu tocmai justificată, se mai vorbește de un alt tip de marcaj radioactiv decît cel intrinsec : înlocuirea unui atom al unui element printr-un radionuclid al altui element se obișnuiește să fie denumită marcaj radioizotopic extrinsec * : astfel tratarea unei albumine cu radioiod (^{131}I, ^{125}I sau ^{123}I) duce la substituirea unuia sau mai multor atomi de hidrogen prin radioiod. Proprietățile moleculei marcate izotopic extrinsec nu mai sînt identice cu ale moleculei nemarcate, dar dat fiindcă acest tip de marcaj se aplică în special la molecule foarte mari cu mulți atomi, substituirea unui atom printr-un element diferit nu modifică decît relativ puțin proprietățile moleculei.

Conform celor de mai sus, o moleculă, de ex. acid acetic, marcată extrinsec, de ex. cu radioiod, este de fapt o moleculă diferită marcată intrinsec ; în cazul de mai sus, este un acid iodoacetic marcat intrinsec cu radioiod. De aceea, ori de cîte ori este posibil, se preferă considerarea și denumirea ca molecule marcate intrinsec : de pildă hipuranul marcat cu radioiod este considerat nu ca acid hipuric radioiodat extrinsec, ci ca acid

---

* Marcajul radioizotopic extrinsec a mai fost denumit marcaj imperfect, marcaj străin, marcaj extern, sau marcaj forțat [5, 6]. În afara acestor denumiri nu tocmai potrivite, s-a folosit și denumirea cu totul improprie, de marcaj neizotopic [7].

Scanned with OKEN Scanner

orto-iod-hipuric marcat intrinsec. Acest lucru nu este însă posibil la moleculele mari cum sînt albuminele radioiodate căci nu sînt caracterizaţi iod-derivaţii neradioactivi ai acestor albumine, iar marcarea este nespecifică. În plus, în cazul techneţiului, care nu are nuclizi naturali, compuşii „nemarcaţi" nici măcar nu există, astfel încît techneţiul nu dă decît marcări extrinseci.

Marcarea extrinsecă se mai subdivide în marcare extrinsecă totală şi marcare extrinsecă trasoare. Astfel, dacă se înlocuieşte fiecare atom de sulf din metionină cu radioseleniu ^{75}Se, se obţine selenometionina — ^{75}Se, care poate fi considerată ca o metionină marcată extrinsec total cu seleniu. Însă la marcarea extrinsecă a unei proteine cu ^{131}I sau ^{99m}Tc, doar o foarte mică proporţie din atomii de hidrogen ai proteinei devin marcaţi extrinsec, de aceea, în acest caz, avem de-a face cu o marcare extrinsecă trasoare. Această ultimă formă de marcare extrinsecă este mai des practicată decît prima, căci ea afectează mai puţin asemănarea chimică a moleculei marcate cu cea nemarcată.

Marcarea extrinsecă este necesară pentru a suplini lipsa unor radioizotopi emiţători γ (sau β^+ de vieţi convenabile) pentru cele patru elemente mai des întîlnite în compuşii organici: carbon, hidrogen, oxigen şi azot.

În practică marcarea extrinsecă se efectuează cu radioiod la molecule mari, şi cu techneţiu - 99m, indiu-133m sau alţi radionuclizi ai unor metale care nu apar în materia vie, la molecule mici, medii sau mari.

3.1.5. MARCAJ SPECIFIC, GENERAL ŞI UNIFORM

Marcajul izotopic este specific pentru o anumită poziţie din moleculă, atunci cînd se schimbă compoziţia izotopică a elementului doar din acea poziţie. Cu alte cuvinte, deşi molecula poate conţine mai mulţi atomi de acelaşi fel, se marchează specific doar un anumit atom, sau cîţiva anumiţi atomi din moleculă. De obicei marcajul prin sinteză duce la marcaj specific. Afară de cazul rar, cînd se lucrează cu radioizotopi fără purtător, marcajul specific implică faptul că majoritatea moleculelor au compoziţie izotopică naturală, dar că unele, puţine la număr, au marcajul în poziţia specificată. Şi multimarcajul anumitor poziţii (nu al tuturor !) din moleculă este tot un marcaj specific.

Moleculele marcate complicate (zaharuri, polipeptide) preparate prin biosinteză (plecînd de la culturi de plante sau microorganisme în $^*H_2O$ sau $^*CO_2$) au izotopii carbonului şi hidrogenului distribuiţi general în molecule. Acest marcaj general se indică prin litera G, în paranteze, după denumirea substanţei, de ex, D-glucoză — $^{14}C(G)$, deşi este posibil ca multimarcarea diferitelor poziţii să nu fie uniformă. Dacă compoziţia izotopică a fiecărei poziţii (neechivalente) din moleculă este aceeaşi, atunci se spune că este vorba de o multimarcare uniformă, indicată prin prescurtarea (U) după denumirea substanţei [7]. Marcarea uniformă este un caz particular al marcării generale.

Scanned with OKEN Scanner

3.1.6. CARACTERUL STATISTIC AL MARCAJULUI IZOTOPIC

Trebuie accentuat că, chiar la marcajul specific, acesta are un caracter statistic.

De pildă, ţinînd seama de faptul că procentele naturale sînt: $^{12}C = 98{,}89\%$; $^{13}C = 1{,}11\%$; $^{1}H = 99{,}985\%$ $^{2}H(= D) = 0{,}015\%$, rezultă că acidul acetic natural nemarcat conţine:

$^{12}CH_3 - {}^{12}COOH : 0{,}9989^2 \times 0{,}99985^4 = 97{,}76\%$

$^{12}CH_3 - {}^{13}COOH : 0{,}011 \times 0{,}9889 \times 0{,}99985^4 = 1{,}09\%$

$^{13}CH_3 - COOH : 0{,}011 \times 0{,}9889 \times 0{,}99985^4 = 1{,}09\%$

$^{13}CH_3 - {}^{13}COOH : 0{,}011^2 \times 0{,}99985^4 = 0{,}01\%$

$CH_2D - COOH : 3 \times 0{,}0015 \times 0{,}99985^3 = 0{,}04\%$

$H_3C - COOD : 1 \times 0{,}015 \times 0{,}99985^3 = 0{,}01\%$

şi cantităţi neglijabile (sub 0,01%) de acid acetic cu $\geqslant 2$ atomi de deuteriu sau cu un atom de carbon-13 şi $\geqslant 1$ atom de deuteriu.

Acidul acetic marcat specific la carboxil cu carbon-14, chiar avînd o activitate specifică destul de mare, de ex. de 1 Ci/mol, are la 60 de molecule nemarcate (adică cu compoziţia izotopică globală de mai sus), o moleculă $^{12}CH_3 - {}^{14}COOH$ (activitatea specifică maximă a carbonului -14, fiind de circa 62 Ci/mol). Un acid acetic dimarcat cu carbon-14, de activitate specifică dublă, are (neglijînd conţinutul de izotopi stabili ^{13}C şi ^{2}H) 1,6% $^{12}CH_3 - {}^{14}COOH$, 1,6% $^{14}CH_3 - {}^{12}COOH$, 96,8% acid acetic nemarcat şi doar 0,025% $^{14}CH_3 - {}^{14}COOH$. Cu alte cuvinte, la activităţi specifice (sau îmbogăţiri izotopice) sub 50% din cele maxime, compuşii multimarcaţi sînt în realitate amestecuri de compuşi monomarcaţi, în care predomină compusul nemarcat. Lucrul acesta este important de reţinut, deoarece arată că, la asemenea activităţi specifice nu trebuie depuse eforturi speciale pentru a avea în aceeaşi moleculă marcajul izotopic: se obţine practic acelaşi lucru amestecînd izomeri izotopici monomarcaţi.

3.1.7. PURITATEA CHIMICĂ ŞI STEREOCHIMICĂ

La un produs chimic oarecare, puritatea chimică se defineşte ca fiind fracţiunea (sau procentajul) din masa acelei substanţe în forma chimică specificată. De exemplu, cînd se spune că o mostră de acid benzoic are puritate de 99,5% aceasta înseamnă că într-un kilogram din mostră se găsesc 995 g de acid benzoic, iar restul de 5 g sînt alte substanţe chimice decît acidul benzoic, de ex. acid ftalic, acid izoftalic etc. În definiţia purităţii chimice se face abstracţie de existenţa izotopilor, de aceea în procentul mai sus amintit de acid benzoic sînt incluse toate speciile cu compoziţia izotopică naturală, adică şi cele care conţin ^{13}C, ^{18}O etc.

La compuşii chimici simpli, conservaţi în condiţii adecuate, puritatea chimică este constantă în timp.

Determinarea purităţii chimice se face prin analiză chimică cantitativă sau prin metode fizico-chimice.

Ca o subdiviziune a purităţii chimice se discută, la substanţele optic active, *puritatea stereochimică sau puritatea optică*, întrucît sinteza

chimică duce de obicei la amestecuri de enantiometri care trebuie apoi separate pentru obținerea enantiometrului fiziologic activ: puritatea stereochimică este raportul dintre cantitatea enantiometrului specificat și cantitatea totală a amestecului de stereoizomeri. Majoritatea metodelor chimice de sinteză a compușilor marcați nu sînt stereoespecifice și de aceea o parte apreciabilă din izotopi se pierde atunci cînd se dorește obținerea unor enantiomeri cu o puritate stereochimică avansată; în asemenea cazuri sînt preferabile metodele biochimice de sinteză.

3.1.8. PURITATEA FARMACEUTICĂ

Pentru utilizare medicală parenterală, se cere absența unor impurități chimice (pirogeni, microorganisme patogene) care apar în cantități atît de reduse încît scapă analizei chimice obișnuite și cer teste biologice de sterilitate și apirogenitate. În aceste teste se creează condiții pentru amplificarea efectului acestor impurități prin incubare *in vitro* un timp determinat (proba de sterilitate, § 6.2.4) sau prin reacție *in vivo* (proba de apirogenitate § 6.2.4).

3.1.9. PURITATEA IZOTOPICĂ: RADIONUCLIDICĂ ȘI RADIOCHIMICĂ

La produșii marcați izotopic fie cu izotopi stabili, fie cu izotopi radioactivi, caracterizarea compoziției izotopice este mai complicată. Ne vom referi în primul rînd la radionuclizi, pentru care se definesc puritatea radionuclidică și puritatea radiochimică [8—13].

La substanțele marcate cu radionuclizi, chiar cele mai simple, puritatea scade continuu în timp, atît din cauza transmutației radionuclidului în alt element prin dezintegrare, cît și din cauza descompunerii provocate de radiațiile nucleare (autoradioliză).

A. **Puritatea radionuclidică** este proporția (procentul) din radioactivitatea totală care se datorează nuclidului specificat. Ea caracterizează cît de bine a fost separat radionuclidul de ceilalți radionuclizi ai aceluiași element sau ai altor elemente. De exemplu, într-un preparat conținînd hipuran-^{131}I, sînt impurități radionuclidice toate moleculele marcate oriunde cu alt radionuclid al iodului (de ex. ^{125}I) sau al oricărui alt element (de ex. ^{131}Te); localizarea chimică a marcajului cu ^{131}I nu contează, de ex. moleculele izotop-izomere ca acidul *para*-iodohipuric-^{131}I, nu constituie impurități radionuclidice. Radioactivitățile datorite altor nuclizi sînt ignorate într-un singur caz și anume atunci cînd se determină puritatea radionuclidică a unui nuclid-părinte care are un radionuclid-fiică cu timp de înjumătățire mai mic decît al nuclidului dat; în acest caz prezența nuclidului-fiică nu poate fi evitată, stabilindu-se un echilibru radioactiv conform celor arătate la § 1.2.3; acesta este cazul „generatorilor de izotopi", unde în calculul purității radionuclidice a nuclidului-părinte, de ex. ^{99}Mo, se ține seama de toți radionuclizii prezenți, cu excepția radionuclidului-fiică, ^{99m}Tc. Reciproca nu este valabilă însă, de aceea prezența ^{99}Mo constituie o impuritate radionuclidică a ^{99m}Tc.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Puritatea radiochimică** este proporţia (procentul) din radionuclidul specificat în forma chimică specificată. Ea caracterizează cît de specific a fost încorporat radionuclidul în molecula dorită şi nu în alte molecule neizomere sau izomere (izomerie de constituţie, de poziţie, geometrică, optică, sau izotopică). Astfel, într-un preparat conţinînd L- alanină-1-^{14}C, sînt impurităţi radiochimice D-alanina-1-^{14}C, L- şi D-alanina-2-^{14}C şi oricare altă moleculă marcată cu carbon-14. Altfel spus, o moleculă marcată specific are ca impurităţi radiochimice toate moleculele izotop-izomere, precum şi orice alte molecule marcate cu acelaşi nuclid.

Compuşi marcaţi cu izotopi stabili. Puritatea compuşilor marcaţi cu izotopi stabili se defineşte similar : nu există o „puritate stabilonuclidă" analoagă celei radionuclidice, ci se dă îmbogăţirea şi nuclidul stabil specificat. Se defineşte însă specificitatea încorporării marcajului printr-o puritate analoagă celei radiochimice, caracterizînd în preparatul dat cît din marcajul stabilonuclidic specificat se găseşte în forma chimică specificată.

În concluzie, purităţile chimice, farmaceutice şi izotopice (radiochimice şi radionuclidice) constituie parametri independenţi, care trebuie controlaţi şi determinaţi separat. La substanţele marcate radioactiv, aceste purităţi scad în timp, de aceea analizele trebuie repetate la perioade determinate. Ca o consecinţă, toate produsele radiofarmaceutice au o durată de valabilitate, termenul de expirare fiind de cel mult trei timpi de înjumătăţire (cînd $T_{1/2} \leqslant 60$ zile), sau (cînd $T_{1/2} > 60$ zile) de maximum 6 luni, în conformitate cu convenţiile internaţionale ratificate de OMS şi AIEA* şi cu recomandările Farmacopeei internaţionale [13].

3.2. ÎNCORPORAREA IZOTOPILOR ÎN COMPUŞI MARCAŢI

3.2.1. INTRODUCERE

S-a arătat mai înainte că pot exista compuşi marcaţi intrinsec (cu radioizotopi sau izotopi stabili), sau extrinsec (cu radioizotopi). În cele ce urmează se vor discuta în general metodele de obţinere a acestor tipuri de compuşi marcaţi, urmînd ca analiza amănunţită a obţinerii compuşilor marcaţi să fie făcută separat pentru fiecare nuclid.

Dat fiind că obţinerea radioizotopilor la reactor sau la ciclotron implică energii mari, forma primară în care rezultă aceşti radionuclizi este de compuşi chimici elementari sau molecule simple anorganice. Îmbogăţirea izotopilor stabili se face, de asemenea, sub formă de molecule mici, organice sau anorganice, care pot fi aduse uşor în fază gazoasă, iar după îmbogăţire izotopii stabili se prelucrează, de asemenea, la compuşi anorganici simpli, lichizi sau solizi, pentru a fi mai uşor transportabili. Astfel, în ambele cazuri, ale marcării cu radionuclizi sau cu izotopi stabili, obţinerea unor molecule organice relativ complicate, utile studiilor biomedicale şi diagnosticului medical, pleacă de la materii prime anorganice simple. Acestea fiind scumpe, trebuie prelucrate cu randament cît mai ridicat în ciuda scalei mici la care au loc reacţiile pentru încorporarea

* OMS = Organizaţia Mondială a Sănătăţii (cu sediul la Geneva).
AIEA = Agenţia Internaţională pentru Energia Atomică (cu sediul la Viena).

Scanned with OKEN Scanner

nuclizilor în molecule organice. De aceea, a apărut un nou capitol al sintezei organice care să satisfacă următoarele cerinţe : materii prime anorganice simple (*H_2O, *CO_2, H_2*SO_4 etc.), scală micro sau semimicro (10 mg — 10 g), randament ridicat la purităţi acceptabile, operaţii puţine, apte a fi comandate de la distanţă pentru activităţi mari, metode rapide pentru radioizotopii de viaţă scurtă, asigurarea radioprotecţiei în sinteză şi în utilizarea produsului.

3.2.2. CLASIFICAREA METODELOR DE ÎNCORPORARE A IZOTOPILOR ÎN COMPUŞI MARCAŢI

Compuşii marcaţi intrinsec sînt cei în care unul sau mai mulţi atomi din moleculă au compoziţia izotopică naturală modificată prin îmbogăţire într-un izotop stabil al aceluiaşi element, ori prin înlocuire parţială („cu purtător") sau totală („fără purtător") cu un radioizotop al aceluiaşi element. Desigur, marcajul intrinsec poate fi specific, general sau uniform, aşa cum s-a arătat mai înainte.

Pentru obţinerea compuşilor marcaţi intrinsec se utilizează patru metode principale : sinteza chimică, schimbul izotopic, metode radiochimice, biosinteza. Ele vor fi discutate pe rînd în cele ce urmează.

3.2.3. MARCAREA INTRINSECĂ PRIN SINTEZĂ CHIMICĂ

Aceasta este metoda cea mai des folosită pentru încorporarea majorităţii izotopilor în compuşi marcaţi. Ea constă în folosirea întregului arsenal de metode chimice de sinteză, implicînd reacţii de adiţie şi substituţie, în majoritatea cazurilor în mai multe faze succesive, pînă la obţinerea produsului final, care se purifică şi condiţionează la forma dorită.

Considerentele economice cer ca randamentul de încorporare al materiei prime celei mai scumpe să fie maxim. Fiindcă practic întotdeauna materia primă cea mai scumpă este compusul anorganic simplu conţinînd izotopul *, randamentul trebuie calculat faţă de această materie primă, spre deosebire de sintezele organice obişnuite. Din acelaşi motiv, trebuie evitată deplasarea echilibrelor prin folosirea unui exces din această materie primă.

TABELA 3.1

Randamentul total al unei sinteze cu mai multe etape

Randamentul fiecărei etape, %	Sinteză cu 5 etape, %	Sinteză cu 10 etape, %
99	95	90
95	77	60
90	59	35
85	44	20

Se ştie că randamentul total al unei reacţii cu mai multe etape este produsul randamentelor fiecărei etape. Cînd numărul etapelor creşte, chiar dacă randamentul fiecărei etape este bun, randamentul total scade apreciabil. Un exemplu simplu ilustrează acest fapt, aşa cum reiese din tabela 3.1.

* Cu excepţia posibilă a deuteriului dintre izotopii stabili şi a tritiului dintre cei radioactivi.

Scanned with OKEN Scanner

Este de aceea important de reţinut că, în planificarea sintezei chimice a unei substanţe marcate, izotopul trebuie introdus într-o etapă cît mai tîrzie, pentru ca numărul etapelor sintezei după introducerea izotopului în moleculă să fie cît mai mic.

Scala la care se practică sinteza compuşilor marcaţi cu radioizotopi trebuie să ia în considerare cei trei parametri ai egalităţii :

$$\text{Activitate specifică} = \frac{\text{Activitate}}{\text{Masă}}.$$

În practică, se cere o activitate specifică ridicată pentru a permite detecţia cît mai uşoară şi posibilitatea diluării cît mai ample cu substanţa inactivă din mediul biologic. Pe de altă parte, în funcţie de timpul de înjumătăţire al radionuclidului, cantităţile de substanţă corespunzînd unei activităţi date, de ex. 1 Ci, şi unei activităţi specifice maxime posibile (vezi tabela 3.2) [14, 15], sînt cu atît mai mici cu cît activitatea specifică maximă este mai mare. Din tabela 3.2. se vede că, conform definiţiei unui

TABELA 3.2

Activitatea specifică maximă posibilă Λ_{max} şi cantitatea de element M corespunzînd acestei activităţi specifice, la o activitate totală de 1 Ci

Radionuclid	$T_{1/2}$	$\Lambda_{max}\left(\frac{\text{Ci}}{\text{atom-gram}}\right)$	$M\left(\frac{\text{mg}}{\text{Ci}}\right)$
^{3}H	12,34 a	29 000	0,1
^{11}C	20 min	$9{,}3 \cdot 10^{9}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$
^{14}C	5736 a	62,4	224
^{18}F	109,7 min	$1{,}71 \cdot 10^{9}$	$1 \cdot 10^{-5}$
^{32}P	14,3 d	$9{,}13 \cdot 10^{6}$	$3{,}5 \cdot 10^{-3}$
^{35}S	87,5 d	$149 \cdot 10^{6}$	0,023
^{99}Tc	$2{,}1 \cdot 10^{5}$a	1,7	58200
^{99m}Tc	6 h	$5{,}22 \cdot 10^{8}$	$1{,}9 \cdot 10^{-4}$
^{125}I	60,1 d	$2{,}17 \cdot 10^{6}$	0,058
^{131}Ia	8,04 d	$1.62 \cdot 10^{7}$	0,008
^{226}R	1600 a	223,6	1000
^{238}U	$4{,}47 \cdot 10^{9}$a	$8 \cdot 10^{5}$	3.10^{9}

$$\Lambda_{max}(\text{Ci} \cdot \text{mol}^{-1}) = \lambda N_0 = \frac{\ln 2 \cdot 6{,}023 \cdot 10^{23}\ (\text{mol}^{-1})}{T_{1/2}\ (\text{s}) \cdot 3{,}7 \cdot 10^{10}(\text{Ci} \cdot \text{s}^{-1})}$$

$$M(\text{mg/Ci}) = \frac{1000\left(\frac{\text{mCi}}{\text{Ci}}\right) A(\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1})}{\Lambda_{max}(\text{mCi} \cdot \text{mmol}^{-1})}$$

curie, un gram de radiu are o activitate de 1 Ci şi că trebuie trei tone de uraniu-238 pentru a rezulta o activitate totală a acestui uraniu de 1 Ci (în uraniul natural există însă şi puţin ^{234}U şi ^{235}U care contribuie şi ei la activitate conform abundenţelor şi timpilor de înjumătăţire). Examinînd radionuclizii implicaţi în compuşii marcaţi şi radiofarmaceutici, se vede că la activitatea specifică maximă, un curie de carbon-14 corespunde unei cantităţi de 0,2 g carbon, un curie de hidrogen-3 unei cantităţi de 0,1 mg tritiu, iar un curie de ^{32}P, ^{25}S, ^{125}I, ^{131}I unor cantităţi de ordinul microgramelor din aceste elemente ; la izotopii de viaţă mai scurtă (^{11}C, ^{18}F, ^{99m}Tc), unui curie îi corespund cantităţi de ordinul 1—100 nanograme. O sinteză organică nu se poate practica la o scală mai mică de 2—5 mmol, fiindcă

Scanned with OKEN Scanner

extracţii sau distilări ale unor cantităţi mai mici decît 0,1 g duc la pierderi enorme de randament. În practică se preferă semimicrosinteze la scara de 20—50 mmol, care dau randamente acceptabile. În cazul radioizotopilor folosiţi curent în medicina nucleară, deşi aceşti radioizotopi pot fi obţinuţi teoretic puri cu activităţi specifice apropiate de cele maxime posibile, prin reacţiile arătate mai jos (tabela 3.3), aproape întotdeauna se adaugă *purtători* pentru a coborî activitatea specifică. În acest fel se poate lucra cu

TABELA 3.3

Reacţii nucleare pentru obţinerea radionuclizilor fără purtător

Radionuclidul dorit	Reacţia nucleară	Sursa
Tritiu	$^{6}Li(n, \alpha)^{3}H$	reactor
Carbon-11	$^{10}B(d,n)^{11}C$	ciclotron
Carbon-14	$^{14}N(n, p)^{14}C$	reactor
Fluor-18	$^{16}O(\alpha,pn)^{18}F$	ciclotron, reactor
Fosfor-32	$^{32}S(n,p)^{32}P$	reactor
Sulf-35	$^{35}Cl(n,p)^{35}S$	reactor
Crom-51	$^{50}Cr(n,\gamma)^{51}Cr$	reactor, recul
Techneţiu-99m	$^{98}Mo(n,\gamma)^{99}Mo \xrightarrow{\beta^-} {}^{99m}Tc$	reactor, generator
Indiu-113m	$^{112}Sn(n,\gamma)^{113}Sn \xrightarrow{\beta^+} {}^{113m}In$	reactor, generator
Iod-123	$^{123}Te(p,n)^{123}I$	ciclotron
Iod-125	$^{125}Te(p,n)^{125}I$	ciclotron
Iod-131	$^{130}Te(n,\gamma)^{131}Te \xrightarrow{\beta^-} {}^{131}I$	reactor

cantităţi mai mari de substanţă, mărind substanţial randamentele, se evită fenomenele de adsorbţie pe pereţii vaselor sau de formare a radiocoloizilor care se petrec atunci cînd se lucrează cu ultramicrocantităţi, şi se reduce autoradioliza compusului marcat final, care este cu atît mai rapidă cu cît activitatea specifică este mai mare.

Cele de mai sus sînt ilustrate cel mai bine printr-un exemplu privind obţinerea unui compus marcat cu carbon-14. Reţinînd că activitatea specifică maximă a carbonului-14 este de 62 Ci/atom-gram, rezultă că activitatea specifică maximă a unei molecule în care se marchează specific un singur atom de carbon este de 62 Ci/mol; la o moleculă marcată specific la doi atomi de carbon, activitatea specifică maximă este de 124 Ci/mol ş.a.m.d. Pentru simplificare, să discutăm cazul metanolului-^{14}C, care conţine doar un singur atom de carbon [16]. La activităţi specifice ridicate, de 10 Ci/mol, la care 16 % din molecule sînt $^{14}CH_3OH$, o activitate totală de 100 mCi corespunde unei cantităţi doar de 0,32 g metanol. Manipularea unor cantităţi mici cu activităţi ridicate pune probleme delicate de randament şi protecţie, de aceea se va prefera adăugarea de purtător pentru a lucra cu activităţi specifice de 10—20 de ori mai mici şi cu cantităţi de 10—20 de ori mai mari. Atunci cînd timpul de înjumătăţire este suficient de lung şi cînd activităţile specifice sînt suficient de joase pentru ca produşii marcaţi să poată fi păstraţi şi transportaţi, ca în cazul compuşilor cu ^{14}C şi ^{3}H, este preferabil ca sintezele chimice complicate şi cu atît mai mult biosintezele, să fie făcute în laboratoare centralizate, specializate, cu activităţi specifice spre limita superioară. Prin diluţie cu produs inactiv, activităţile specifice pot fi reduse la nivelul cerut de determinare şi de metoda de analiză folosită.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul izotopilor de viaţă mai scurtă sau în cazul sintezelor simple ori al schimbului izotopic, încorporarea se poate face în laboratoare mici (desigur, autorizate să manipuleze radioizotopi), planificînd activitatea specifică la nivelul minim cerut de determinare.

Sinteza compuşilor marcaţi cu izotopi stabili este tot la scală micro- sau semimicro din cauza costului ridicat al izotopilor (cu excepţia deuteriului). Datorită necesităţii de a obţine randamente cît mai ridicate, fără a avea posibilitatea de a adăuga purtător (substanţă nemarcată) decît în proporţie redusă pentru a nu coborî îmbogăţirea izotopică, sinteza compuşilor marcaţi cu izotopi stabili este asemănătoare cu sintezele radioizotopice urmărind activităţi specifice ridicate. Diferenţa provine din faptul că nu mai sînt necesare măsuri de radioprotecţie şi că intermediarii sau produşii nu mai suferă autoradioliză.

Strategia adaosului de purtători diferă de la caz la caz, dar este bine de notat că eficienţa adaosului de purtător este mai ridicată în stadiile finale sau în separările şi purificările complicate: prin adaos de substanţă nemarcată la un amestec de reacţie, puritatea chimică a compusului din amestec se măreşte şi separarea devine mai uşoară. Alteori devine avantajos să se adauge tot purtătorul într-o singură etapă, de pildă în obţinerea acidului acetic anhidru: prin carbonatarea iodurii de metilmagneziu (fie CO_2, fie CH_3MgI, fie ambele, pot fi marcate cu ^{14}C sau ^{13}C) se obţine acetat de sodiu anhidru; prelucrarea acestuia fără diluţie izotopică la acid acetic marcat duce la pierderi mari. Dacă însă se admite o diluţie de 10 ori, cel mai simplu este adaosul a 9 moli de acid acetic anhidru nemarcat peste acetatul de sodiu marcat, urmat de echilibrarea marcajului şi distilarea acidului acetic care duce la un acid acetic conţinînd 90% din carbonul izotopic al acetatului de sodiu [16].

În obţinerea unor compuşi marcaţi optic activi, unde sinteza chimică duce la un amestec racemic cu ambii enantiomeri marcaţi, adaosul enantiomerului dorit ca purtător nemarcat optic pur în exces şi reizolarea lui scuteşte adesea de scindări laborioase [17, 18]. Astfel, obţinerea L-aminoacizilor ^{14}C se poate face adăugînd soluţiei amestecului racemic DL obţinut prin sinteză o cantitate de 10—100 de ori mai mare de L-aminoacid nemarcat pur, şi reizolîndu-l prin cristalizare; cîteva recristalizări sînt necesare pentru purificarea totală şi atingerea unei activităţi specifice care nu mai scade.

3.2.4. MARCAREA INTRINSECĂ PRIN SCHIMB IZOTOPIC

Reacţia prin care o moleculă $R-{}^*X$ şi una nemarcată $R'-X$ conţinînd izotopi diferiţi ai aceluiaşi element X, îşi echilibrează între ele izotopii constituie o marcare intrinsecă prin schimb izotopic:

$$R-{}^*X + R'-X \rightleftharpoons R-X + R'-{}^*X$$

Limitările metodei provin din faptul că numai anumite elemente (hidrogenul, halogenii Cl, Br, I şi calcogenii O, S, Se) dau această reacţie şi, chiar atunci, doar la anumite clase de compuşi şi în anumite condiţii de reacţie.

Prin mecanismul reacţiei, schimbul izotopic este de fapt o substituţie.

Se ştie că hidrogenul legat de elemente electronegative ca halogenii, oxigenul, sulful şi azotul dă extrem de uşor schimb izotopic cu hidrogenul din apă; astfel de marcaj se realizează de aceea instantaneu, dar el este

labil şi de aceea este rar util, fiind de obicei un dezavantaj. Din contră, hidrogenul legat de carbon nu schimbă decît în condiţii speciale : în prezenţă de catalizatori eterogeni sau omogeni (acizi sau baze) şi în poziţii activate specific, de ex. poziţii învecinate cu grupe carbonil. Prezenţa a două grupe carbonil, ca în esterul malonic, activează cei doi hidrogeni astfel încît ei schimbă aproape la fel de uşor ca hidrogenii labili ; acest lucru este util în sinteze de compuşi deuteraţi sau tritiaţi întrucît prin hidroliză şi decarboxilare se obţine acid acetic marcat la metil, care nu mai are hidrogen labil, deoarece nu mai are decît o grupă carbonil învecinată [19].

O variantă interesantă a schimbului izotopic este tritierea compuşilor organici prin metoda Wilzbach* : $RH + T_2 \rightarrow RT + HT$. Expunînd compuşi RH care conţin hidrogen, într-o atmosferă de tritiu gazos, timp de cîteva zile, se produce un schimb izotopic sub acţiunea radiaţiei β a tritiului. Practic, toţi atomii de hidrogen pot da această reacţie, indiferent de vecinătăţile chimice şi de starea fizică a substanţei (solidă, lichidă sau pulbere) ; astfel, se poate tritia practic orice substanţă organică, oricît de complicată. Dezavantajul este randamentul redus datorită descompunerii avansate a substanţei de marcat, ceea ce necesită purificări laborioase [19—21].

Schimbul izotopic este, de asemenea, indispensabil în sinteza numeroaselor produse radiofarmaceutice conţinînd iod radioactiv (^{123}I, ^{125}I sau ^{131}I), prin reacţie între compusul nemarcat şi iod elementar sau iodură de sodiu : Roz-bengal, acid *orto*-iodo-hipuric, tiroxină, triiodotironină etc. [6].

Oxigenul sau sulful dublu legate de carbon dau schimb izotopic cu alţi compuşi oxigenaţi, (H_2O), respectiv cu sulf elementar.

3.2.5. MARCAREA INTRINSECĂ PRIN BIOSINTEZĂ

Obţinerea unor compuşi cu structură complicată şi cu configuraţie sterică determinată este dificilă prin sinteză chimică, dar se poate realiza prin metode biochimice. Astfel de compuşi sînt zaharurile, vitaminele, hormonii, polipeptidele, polinucleotidele.

Biosintezele se pot clasifica după mai multe criterii.

— După natura substratului : substrat anorganic ($*CO_2$, $*NH_3$, $*H_2O$), substrat organic (de sinteză chimică, ca acetat, glucoză-1-^{14}C, sau biosintetic ca glucoza-^{14}C(G)).

— După natura catalizatorului : enzime purificate, ţesuturi animale sau vegetale, plante sau animale intacte, metode microbiologice.

Nu se va intra aici în detalii privind biosinteza, întrucît ele se dau în paragrafele privind obţinerea compuşilor marcaţi cu ^{14}C sau cu tritiu [19, 22—26].

Trebuie însă menţionat că uneori se asociază o sinteză chimică care dă, de ex. un aminoacid racemic marcat, cu o etapă biosintetică în care din amestecul racemic se obţine, prin metode enzimatice, un anumit enantiomer.

---

* Ea va fi amintită şi mai departe, la sinteze radiochimice.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.6. MARCAREA INTRINSECĂ PRIN SINTEZE RADIOCHIMICE

Încorporarea marcajului sub acţiunea radiaţiilor, precum şi prin reacţia atomilor radioactivi posedînd o mare energie cinetică (fie datorită reculului nuclear, fie accelerați artificial), constituie sinteze radiochimice. În prezent, importanţa lor practică este redusă, cu excepţia tritierii prin metoda Wilzbach discutată mai înainte la schimbul izotopic (aceasta, prin natura ei, este de fapt o sinteză radiochimică, căci moleculele de marcat sînt excitate prin radiaţiile β ale tritiului). Pentru scurtarea timpului de expunere şi reducerea descompunerii substratului, se preferă actualmente ca tritierea Wilzbach să se efectueze folosind surse suplimentare externe de energie pentru excitare: descărcări electrice, microunde, radiaţii γ sau ultraviolete [19, 20].

În anul 1934, Szilard şi Chalmers activînd cu neutroni iodul din iodura de metil au observat [27] că radioiodul format prin reacţia $^{127}I\,(n,\,\gamma)\,^{128}I$ se poate extrage parţial cu apă ca iod anorganic (I_2 şi I^-) şi au explicat această prin ruperea legăturii chimice $H_3C—I$ în momentul emisiei fotonului gamma care produce un recul nuclear, imprimînd atomului de iod radioactiv suficientă energie cinetică pentru această rupere. Acest iod anorganic este fără purtător, deşi provine dintr-o reacţie $(n,\,\gamma)$. În fază gazoasă, sau în soluţie diluată, majoritatea radioiodului apare ca iod anorganic, dar în iodura de metil lichidă, radioiodul apare peste 50% ca ioduri organice (CH_3I şi CH_2I_2) datorită substituţiei prin atomii de iod care au suferit reculul, ceea ce duce la o *retenţie* aparentă a radioactivităţii în substanţa iniţială. Desigur, activitatea specifică a iodurii de metil astfel obţinută va fi redusă.

Asemenea înglobări de radioizotopi sub acţiunea reculului nuclear au fost folosite pentru a marca şi compuşi organici cu carbon sau tritiu de înaltă activitate specifică produşi prin reacţiile $^{14}N\,(n,\,p)\,^{14}C$, respectiv $^{6}Li(n,\,\alpha)\,^{3}T$. În practică se iradiază în reactor compuşi conţinînd azot sau litiu, sau amestecuri de asemenea compuşi cu substanţele care urmează a fi marcate, iar pentru izolarea produşilor doriţi se adaugă purtător [28—34].

Dezavantajele metodei constau în marcarea nespecifică şi în descompunerea pronunţată a substratului, ceea ce necesită purificări avansate.

Alte sinteze radiochimice decît cele prin recul nuclear sînt următoarele:

— marcare prin ioni accelerați, care nu diferă de marcarea prin recul decît prin faptul că energia „atomului fierbinte" folosit pentru marcare nu este furnizată de recul ci de un accelerator de particule;

— marcarea prin excitare (denumită şi marcarea indusă de transformarea nucleară): noul atom format în urma unei transformări nucleare prin captură electronică, sau prin dezintegrare β^+, rămîne deficitar în electroni şi, ca ion pozitiv sau ca atom liber, este foarte reactiv, putînd da uşor legături covalente;

— marcare prin descărcări electrice, marcare indusă de radiaţii, şi marcare de tip Wilzbach: asemenea marcări se folosesc în general la tritieri şi vor fi discutate în amănunt în § 4.10.3, dar în anumite cazuri se pot aplica şi la marcarea cu alţi radionuclizi, de ex. ^{11}C.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.7. MARCAREA EXTRINSECĂ PRIN REACȚII CHIMICE

Marcarea extrinsecă se realizează întotdeauna numai cu radioizotopi, nu și cu izotopi stabili.

Ca și la marcarea intrinsecă, metodele de înglobare a unui radioizotop într-o moleculă sînt multiple; totuși, dat fiind că radioizotopul este „străin" de moleculă, în practică se utilizează doar metode simple: adiție, substituție (ca în sinteză), legare prin legături coordinative.

În practică, de obicei marcarea extrinsecă se efectuează cu nuclizi γ-activi pentru diagnostic prin scintigrafie sau testare *in vitro*. Cei mai folosiți nuclizi sînt halogenii (^{18}F, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I) sau metale produse cu generatori (^{99m}Tc, ^{113m}In, ^{87m}Sr) sau acceleratoare (^{67}Ga, ^{51}Cr, ^{52}Fe, ^{64}Cu, ^{130}Cs).

O condiție importantă a marcării extrinseci este de a nu produce o modificare prea avansată a moleculei marcate, căci, spre deosebire de marcarea intrinsecă care duce la molecule izotop-izomere, marcarea extrinsecă duce la molecule diferite. În cazul înlocuirii unui atom de H cu ^{18}F, stereochimia moleculei nu este decît puțin afectată căci razele covalente* ale protonului și fluorului sînt foarte asemănătoare; desigur, însă, electronegativitatea extremă a fluorului produce modificări în densitățile electronice ale moleculei. Cu ceilalți radioizotopi modificările sînt și mai pronunțate, căci razele covalente ale metalelor și ale iodului depășesc apreciabil raza covalentă a protonului. De aceea, marcarea extrinsecă a unor molecule mici cum sînt aminoacizii, bazele purinice și pirimidinice, păstrează unele specificități față de receptorii biologici cînd este efectuată cu ^{18}F, dar nu cu alți radionuclizi. Pe de altă parte, marcarea extrinsecă a unor molecule mari sau agregate (enzime, lipide, polizaharide, hormoni, proteine, coloizi, microsfere, macroagregate) cu oricare din radioizotopii menționați este larg practicată, deoarece nu este afectată prin marcajul extrinsec decît o parte neesențială a moleculei, depărtată de zona activă implicată în interacțiunea cu receptorii celulari. În plus, această marcare extrinsecă este o marcare trasoare, cu maximum un atom de radioizotop per macromoleculă: s-a observat că depășind această limită se modifică mult proprietățile moleculei marcate, iar la proteine se produc și denaturări din cauza modificării configurației spațiale (structurii terțiare).

Spre deosebire de sintezele chimice, care sînt laborioase, marcările extrinseci implică de obicei doar o singură etapă în care are loc fixarea radioizotopului pe molecula de marcat, urmată de purificare.

Un exemplu de adiție la duble legături C = C ale catenelor nesaturate din lipide (trioleină sau acid oleic) este marcarea extrinsecă cu Cl*I (din Na*I, $NaIO_3$ și HCl sau Cl_2). S-a observat că adiția de *ICl la duble legături duce la produși de adiție mai stabili decît adiția de $*I_2$ [6].

Exemplele de substituție sînt mai numeroase, ele pot fi clasificate în cazul iodului precum urmează:

1) Iodurarea directă la inele aromatice (benzenice sau heterociclice) reactive, de ex. la ciclul tirozinic sau histidinic din aminoacizii respectivi. Se folosesc reactivi de iodurare care să producă cationi electrofili $*I^+$,

* Aceste raze covalente sînt dimensiunile atomilor în molecule, măsurate prin diferite metode fizice (radiații X, difracția electronilor).

de ex. prin disocierea I_2 sau ICl. Obținerea iodului sau clorurii de iod pornește de la iodura de sodiu de mare activitate specifică, prin oxidare cu KIO_3, $NaNO_2$, H_2O_2, persulfați alcalini etc. Iodul liber sau KI_3 dau iodurări blînde, fără formare de produși secundari, putîndu-se regla concentrația iodului prin tampoane de anumite pH-uri sau prin reglarea concentrației iodurii [35]. Cu KI_3 sau I_2 s-au iodurat proteine, de ex. serumalbumină umană. În soluție alcalină diluată, iodul este parțial prezent sub formă de hipoiodit, iar grupele fenolice sub formă de fenoxid; reacția este specifică și are loc rapid la rece. Folosind ICl în soluție apoasă diluată, obținută din $*I^-$, IO_3^- și HCl sau din $*I^-$ și dicloramină-T, $TsNCl_2$,* sau în solvenți organici din Cl_2 și $*I^-$, se pot de asemenea iodura proteine sau compuși fenolici. Pentru iodurarea moleculelor care suferă ușor degradări, cum sînt hormonul de creștere uman (proteină) sau hormonii tiroidieni, s-a folosit [36, 37] un oxidant blînd, cloramina-T, TsNHCl, care se presupune că formează intermediar iodamina analoagă TsNHI.* Pentru unii compuși sensibili s-a recurs și la iodurări electrochimice la potențial controlat și la pH-uri tamponate (în intervalul pH = 5—8) electrolizînd substratul în soluție apoasă conținînd radioiodură [38].

2) Iodurarea polizaharidelor (inulină, dextran etc.) prin adiție la grupe active introduse în acest scop: bromură de alil $BrCH_2—CH = CH_2$ sau de propargil $BrCH—C \equiv CH$, ducînd la eteri alilici sau propargilici ai polizaharidelor, care apoi sînt tratați ca mai sus cu I_2 sau ICl [39, 40].

3) Iodurarea (cu radioiod-123, 125 sau 131) sau fluorurarea (cu ^{18}F) a nucleelor aromatice prin reacție Sandmeyer. Atunci cînd ciclurile aromatice benzenice sau heterociclice Ar nu sînt activate prin grupe fenolice pentru substituție electrofilă, se poate utiliza descompunerea termică a sărurilor de diazoniu obținute prin diazotarea aminelor aromatice, în prezența anionilor Hal^- de halogenură simpli sau complecși ($*I^-$ sau $*I_3^-$ [41]; $^{18}F^-$ sau $B\,^{18}F_4^-$):

$$Ar—NH_2 + HNO_2 \xrightarrow[-2H_2O]{+H^+} Ar—\overset{+}{N} \equiv N \xrightarrow[-N_2]{+Hal^-} Ar—Hal$$

Pentru fixarea fluorului-18 aceasta este principala metodă. În cazul iodurării, metoda a fost folosită pentru obținerea polivinil-pirolidonei-^{131}I, prin introducerea de resturi *p*-toluidinice care apoi au fost diazotate și tratate cu radioiodură în condițiile reacției Sandmeyer [42, 43].

În toate cazurile de iodurare menționate mai sus, excesul de iodură sau iod anorganic trebuie îndepărtat prin purificări care fac uz de cromatografie pe coloană, strat subțire ori hîrtie, de extracție cu solvenți, schimb ionic, filtrare prin gel pe coloane impregnate cu săruri de argint, dializă, precipitare etc. Dată fiind energia joasă a legăturii carbon-iod, asemenea legături covalente se rup ușor prin radioliză sau fotoliză, de aceea trebuie determinate atent condițiile de conservare și durata de valabilitate a produsului pentru a nu folosi produși cu un conținut nepermis de mare de iod anorganic (rămas de la preparare sau format prin autoradioliză în timpul conservării) care ar vătăma pacienții.

Marcarea extrinsecă cu metale tranziționale, cum este marcarea serumalbuminei umane sau a inulinei cu ^{51}Cr [44], marcarea serumalbuminei umane cu ^{99m}Tc, ori marcarea unor coloizi sau chelați cu pertechne-

* Radicalul tosil sau *p*-toluensulfonil, $p\text{-}H_3C—C_6H_4—SO_2$ se prescurtează cu Ts.

tat-^{99m}Tc sau cu ^{113}In se bazează pe faptul că aceste metale se reduc în mediul de reacție de la o valență superioară Cr(VI) sau Tc(VII), la una inferioară, Cr(III) și Tc(V) sau Tc(IV), iar în această stare de valență inferioară, metalul este legat prin legături coordinative sau ionice de substrat, în multe cazuri cu formarea unor cicluri chelatice foarte stabile. Problema stării de valență a acestor metale în produsul utilizat și a naturii exacte a legăturii nu este încă complet elucidată [45].

3.2.8. MARCAREA EXTRINSECĂ PRIN EXCITARE [46, 47]

Spre deosebire de reculul nuclear asociat transformărilor de tip (n, γ), (n, α) sau (n, p) care are energii de mii de ori mai mari decît legăturile chimice, dezintegrările de tip β^+, captură electronică sau tranziție internă, dau recul de o energie doar puțin mai mare decît energia legăturilor chimice, de aceea radioliza datorită reculului este neglijabilă în aceste cazuri. Atomii rezultați în urma unei transformări nucleare, indiferent de energia de recul, se află însă în *stări excitate electronic*, în urma cascadei de electroni Auger, de obicei rămînînd cu mai multe sarcini pozitive. Acestea sînt rapid neutralizate cu electroni din mediul înconjurător lăsînd acești atomi sub formă de radicali ori atomi liberi sau de ioni cu 1—2 sarcini pozitive. În această formă, acești atomi sînt extrem de reactivi și pot da ușor cele mai variate legături chimice, de aceea acest proces se numește marcarea prin excitare. Prin producerea unor atomi-părinte de gaze nobile cu viață scurtă la ciclotron, se creează „generatori în fază gazoasă" care pot fi apoi folosiți pentru asemenea marcări [48]: atomii nuclidului-fiică se leagă chimic de moleculele adsorbite pe pereții vasului (sau, în lipsa lor, chiar de pereții vasului în care se găsește gazul-părinte generator).

TABELA 3.4

Obținerea unor halogeni radioactivi la ciclotron pentru marcări prin excitare

Reacție nucleară la ciclotron	Reacție nucleară având loc în faza gazoasă
$^{20}Ne(^3He, 2p3n)\ ^{18}Ne$	$^{18}Ne \xrightarrow[1,5\ s]{\beta^+} {}^{18}F$ [$T_{1/2}$=110 min]
$^{76}Se(\alpha, 3n)\ ^{77}Kr$	$^{77}Kr \xrightarrow[1,2h]{\beta^+} {}^{77}Br + {}^{77m}Br \xrightarrow[4,3\ min]{TI} {}^{77}Br$ [$T_{1/2}$=56h]
$^{122}Te(\alpha, 3n)\ ^{123}Xe$	$^{123}Xe \xrightarrow[2,1\ h]{\beta^+, CE} {}^{123}I$ [$T_{1/2}$ = 13,2 h]
$^{127}I(p, 3n)\ ^{125}Xe$	$^{125}Xe \xrightarrow[16,8\ h]{CE} {}^{125}I$ [$T_{1/2}$ = 60 d]

Așa cum se arată în tabela 3.4, se folosesc pentru asemenea marcări prin excitare halogeni (^{18}F, ^{77}Br, ^{123}I sau ^{125}I). A.P. Wolf și colab. au depus pe pereții unui vas de sticlă verdele de indocianină (un colorant solubil în apă, folosit în studiile hepatice și cardiace). Apoi s-a vidat vasul și s-a introdus ^{123}Xe care s-a condensat cu azot lichid în vas și a fost lăsat la 77°K timp de 6 ore (trei timpi de înjumătățire) apoi s-a reizolat și purificat colorantul care a fost găsit marcat cu ^{123}I (randament 20%) [49].

Scanned with OKEN Scanner

3.3. AUTORADIOLIZA ŞI CONSERVAREA COMPUŞILOR MARCAŢI CU RADIOIZOTOPI

3.3.1. INTRODUCERE

Descompunerea substanţelor sub acţiunea radiaţiilor ionizante poartă numele de radioliză. Cînd radiaţiile ionizante provin din însuşi compusul marcat radioizotopic, descompunerea a fost denumită autoradioloză. Observaţii datînd încă din 1953, publicate de Tolbert, Calvin şi colab. [50] au arătat că substanţe stabile din punct de vedere chimic se descompun lent atunci cînd sînt marcate cu radioizotopi, datorită acţiunii radiaţiilor emise de aceşti radioizotopi. Studii ulterioare au arătat că este vorba de un fenomen complex în care natura substanţei şi a radioizotopului, activitatea specifică a probei, energia şi natura radiaţiei, timpul de înjumătăţire a radioizotopului, condiţiile de conservare (starea fizică a substanţei, temperatură) şi prezenţa altor substanţe (impurităţi chimice, solvenţi, oxigenul atmosferic) [51—57], influenţează fiecare în parte fenomenul.

3.3.2. AUTORADIOLIZA COMPUŞILOR MARCAŢI CU RADIOIZOTOPI

După Bayly, Catch şi Evans, pe baza cercetărilor efectuate la Centrul radiochimic de la Amersham, autodegradarea compuşilor marcaţi cu radioizotopi este atribuită următoarelor cauze [7, 16, 19, 51, 58—60]:

A. **Efectul primar intern** al radiaţiilor, datorat descompunerii moleculelor care conţin radioizotopul, în momentul dezintegrării acestuia: declanşarea energiei de dezintegrare şi transformarea într-un alt element distrug moleculele. Acest efect, a cărui contribuţie depinde de timpul de înjumătăţire şi de activitatea specifică, nu poate fi evitat sau atenuat. Dacă într-o moleculă marcată există cel mult un atom radioactiv care prin dezintegrare dă un nuclid stabil (astfel este cazul ^{14}C sau ^{3}H), atunci indiferent dacă noul atom este sau nu reţinut în moleculă, prin efectul primar intern nu iau naştere impurităţi radiochimice. Acestea apar doar dacă în moleculă există doi sau mai mulţi atomi radioactivi, în momentul cînd unul din ei se dezintegrează: este cazul compuşilor general sau uniform marcaţi, şi al macromoleculelor obţinute prin polimerizarea monomerilor marcaţi.

La moleculele mici marcate cu radioizotopi de viaţă medie sau lungă, cu activităţi specifice uzuale, acest efect are contribuţie neglijabilă: s-a calculat [7] că la conservarea timp de un an a unei zaharoze marcate uniform cu ^{14}C, cu o activitate specifică ridicată, corespunzînd unei abundenţe izotopice de 20% a ^{14}C, se formează doar 0,03% impurităţi radiochimice. Pe de altă parte, la aceeaşi activitate specifică, o polizaharidă compusă din 1000 resturi de glucoză ar da 1,33% impurităţi radiochimice pe lună, ceea ce, în funcţie de utilizare, poate necesita o atenţie specială.

B. **Efectul primar extern** al radiaţiilor datorat acţiunii directe a radiaţiilor ionizante (emise la dezintegrare) asupra moleculelor marcate înconjurătoare. Aşa cum s-a arătat în § 1.3.1, radiaţiile β interacţionează mai puternic decît fotonii γ. Susceptibilitatea unei substanţe de a reacţiona

Scanned with OKEN Scanner

sub acţiunea radiaţiilor ionizante se exprimă prin factorul $G(-M)$, utilizat curent în chimia sub radiaţii. Acest factor, determinat experimental, arată numărul de molecule M transformate (descompuse) ireversibil la absorbţia în sistem a unei energii de 100 eV. În cazul reacţiilor obişnuite, $G(-M)$ are valori cuprinse între 10^{-1} şi 10, dar în cazul polimerizărilor şi al altor reacţii înlănţuite, $G(-M)$ poate atinge valori mult mai mari, de ordinul 10^4.

Efectul primar extern al radiaţiilor este mai important decît cel intern. La compuşii marcaţi cu radioizotopi emiţători β moi, cum sînt ^{14}C, ^{35}S şi în special ^{3}H, toată energia electronilor este absorbită în mediu, ceea ce permite calcularea dozei de radiaţii după formula :

$$\text{Doza (în rad)} = \frac{N \cdot E(\text{eV}) \cdot 1{,}6 \cdot 10^{-12}(\text{erg/eV})}{100\, m\,(\text{grame})},$$

unde N este numărul de dezintegrări, E energia medie a unei radiaţii β absorbite (45 000 eV pentru ^{14}C, 5 700 eV pentru ^{3}H, 50 000 eV pentru ^{35}S), iar m masa substanţei. La o activitate specifică de 1 mCi/mg, un compus marcat cu tritiu ($N = 3{,}2 \cdot 10^{12}$ dezintegrări pe zi) absoarbe o doză de $3 \cdot 10^5$ rad/zi sau $1{,}1 \cdot 10^8$ rad/an, iar un compus marcat cu ^{14}C absoarbe o doză de $2{,}3 \cdot 10^6$ rad/zi sau $8{,}3 \cdot 10^8$ rad/an. Tabela 3.5 arată cum influenţează aceste valori descompunerea substanţei.

TABELA 3.5

Descompunerea procentuală a unui compus organic ipotetic cu masa moleculară egală cu 125 g/mol

Doza absorbită, rad \ $G(-M)$	5	10	20
10^6	0,06 %	0,12 %	0,24 %
10^7	0,59 %	1,19 %	2,38 %
10^8	5,8 %	11,3 %	21,4 %
10^9	45,0 %	70,2 %	90,9 %

Deşi nu se poate evita eliberarea energiei de dezintegrare, efectul primar extern al radiaţiilor se poate micşora prin reducerea energiei absorbite în sistem (de ex. distribuind compusul marcat într-un strat cît mai subţire) şi prin ecranarea compusului marcat, radiosensibil, cu molecule inerte (solvent sau suport solid).

C. **Efectul secundar** al radiaţiilor, care împreună cu precedentul constituie principala cauză a radiolizei, se datoreşte interacţiunii moleculelor marcate cu diferitele specii chimice reactive (de ex. radicali liberi) produse prin efecte primare, şi provenind fie din compusul marcat, fie din solvent, din impurităţi chimice sau din containerul folosit.

Împreună cu efectul primar extern, efectul secundar al radiaţiilor se exprimă prin randamentul de descompunere $G(-M)$ şi este influenţat de aceiaşi factori. Spre deosebire de efectul primar, efectul secundar mai este influenţat şi de temperatură, de aceea pentru a reduce autoradioliza se mai utilizează conservarea la temperaturi foarte scăzute (—196°C).

Scanned with OKEN Scanner

Nu întotdeauna sînt înțeleși toți factorii care determină randamentele de descompunere $G(-M)$. Astfel, clorura cholinei marcată la metil cu ^{14}C, de activitate specifică 1,5 mCi/mmol, conservată 7 săptămîni la temperatura camerei sub formă cristalizată în vid suferă descompunere în proporție de 27% avînd un randament autoradiolitic $G(-M)$ de 1730 molecule/100 eV, dar iodura cholinei are o valoare normală, în jur de 10 molecule/100 eV [60]. Nu totdeauna doza de iradiere corelează cu descompunerea, cum s-a dovedit comparînd autoradioliza fenilalaninei marcate cu ^{14}C, cu efectul radiațiilor produse de o sursă externă asupra aceluiași produs nemarcat.

Pentru a capta radicalii liberi implicați în efectul secundar al radiațiilor, și deci pentru a reduce autoradioliza, se mai folosesc agenți inhibitori (cel mai util pare a fi etanolul : 1—2% etanol adăugat la aminoacizii marcați cu ^{14}C reduce descompunerea de 6 ori). Se evită prezența speciilor chimice care dau radicali reactivi, de ex. apa, uscînd cît mai perfect compușii marcați.

D. Efecte chimice, nelegate de prezența radiațiilor, produse de agenții chimici (impurități, aer etc.) din probă: dat fiind că adesea compușii marcați radioizotopic sînt preparați în cantități și concentrații mai mici decît cei nemarcați, pot apărea reacții diferite de cele observate cu compușii nemarcați.

3.3.3. CONSERVAREA COMPUȘILOR MARCAȚI CU RADIOIZOTOPI

Din cele arătate în paragraful precedent, reiese că, spre deosebire de compușii chimici obișnuiți, compușii marcați cu radioizotopi nu se pot conserva un timp oricît de îndelungat, din cauza autoradiolizei. Acest fapt a determinat organismele internaționale (OMS, AIEA) să recomande ca toți producătorii de radiofarmaceutice să adopte o durată de valabilitate, adică un termen de expirare al produselor radiofarmaceutice [13]; se recomandă beneficiarilor să verifice puritatea produselor care, uneori, din motive încă incomplet înțelese, poate scădea sub limitele acceptabile. Pentru ca, în interiorul duratei de valabilitate, descompunerea să fie cît mai redusă, la substanțele marcate cu radioizotopi care au fie o mare radiosensibilitate adică valori $G(-M)$ mari, fie o mare activitate specifică adică absorb o doză ridicată de radiații, se pot lua următoarele măsuri :

— se prepară șarje relativ mici de compus marcat, pentru ca între preparare și utilizare să treacă un timp cît mai scurt, iar păstrarea să nu depășească durata de valabilitate ;

— se analizează din nou periodic, compusul marcat (a se vedea mai jos) ;

— se marchează substanța la activitatea specifică minimă necesară ;

— se alege astfel radionuclidul încît să micșoreze autoradioliza : astfel ^{125}I dă produse mai stabile decît ^{131}I ;

— cînd trebuie evitată diluarea, se conservă compușii la temperatură scăzută (—196°C) în fiole vidate sau umplute cu un gaz inert (azot sau argon) lipsit de oxigen. Uneori se observă efecte curioase ale temperaturii : timidina tritiată, dizolvată în apă și conservată între —20 și —40°C se descompune mai repede decît la 0° ori la —75°C. Probabil că în domeniul menționat de temperatură apar neomogenități căci la înghețare

Scanned with OKEN Scanner

timidina se concentrează formînd „pungi în gheaţă" unde are loc o descompunere mai activă ;

— cea mai eficientă măsură de conservare este dispersarea într-un diluant solid ori un solvent lichid. Dizolvarea în solvenţi reduce mult efectul primar extern, dar afectează diferit efectul secundar, căci radicalii produşi de către moleculele solventului pot avea efecte nefavorabile. Solvenţii aromatici (benzenul) sînt cei preferaţi. Cînd nu se poate evita folosirea apei, cum este cazul unor zaharide insolubile în alţi solvenţi, adaosul unor antioxidanţi este util. Diluanţii solizi au fost mai rar folosiţi : conservarea zaharidelor marcate s-a realizat în condiţii bune prin dizolvare în apă, impregnarea pe hîrtie de filtru şi uscare. Tot aici se poate încadra şi răspîndirea pe suprafeţe inerte mari, de exemplu pe cărbune activ (în special pentru compuşii marcaţi cu ^{14}C, căci, la cei marcaţi cu ^{3}H, parcursul radiaţiei β este atît de redus încît această măsură nu ajută) ;

— adaosul de inhibitori şi antioxidanţi este uneori util, de ex. etanolul. Uneori alcoolul benzilic, care este folosit şi ca bactericid, măreşte astfel stabilitatea compuşilor marcaţi ;

— puritatea chimică joacă un rol mai mare în stabilitatea compuşilor marcaţi decît a celor nemarcaţi. Uneori urme de impurităţi sau vase imperfect curăţate reduc apreciabil durata conservării ;

— în fine, fiind mai sensibili, compuşii marcaţi trebuie feriţi de lumină mai mult decît cei nemarcaţi, cum s-a observat cu colesterolul marcat în soluţii foarte diluate.

3.3.4. CONTROLUL PERIODIC AL PURITĂŢII COMPUŞILOR MARCAŢI CU RADIOIZOTOPI

În funcţie de timpul de înjumătăţire al radioizotopului, de activitatea specifică şi de condiţiile de conservare, se recomandă un control al purităţii compuşilor marcaţi cu radioizotopi sau radiofarmaceutici înainte de utilizare.

În general, autoradioliza nu duce la modificări sistematice ale constantelor fizice (punct de topire sau punct de fierbere, indice de refracţie), ale spectrelor de absorbţie în infraroşu sau ultraviolet, deoarece aceste metode nu sînt destul de sensibile [60].

Nici colorarea produselor marcate nu este un indiciu asupra purităţii lor ; adesea se produce o colorare intensă datorită prezenţei unor radicali liberi în cantităţi neglijabile, de ex. în cazul tiosemicarbazidei-^{35}S care în stare solidă se colorează rapid în verde, apoi în negru, dar soluţia este incoloră şi nu se detectează impurităţi [7].

Pentru analiză se folosesc metode exacte cum sînt :

— diluţia izotopică inversă (adaosul unei proporţii cunoscute de compus nemarcat pur, omogenizarea probei, reizolarea compusului pur şi măsurarea activităţii specifice) ;

— metode cromatografice (pe coloană, pe hîrtie, în strat subţire) sau gaz-cromatografice ; trebuie însă evitată descompunerea care se

Scanned with OKEN Scanner

produce uneori în contact cu hîrtia, de ex. la ribuloză marcată cu ^{14}C, sau cea care are loc la încălzirea unor compuşi tritiaţi ;

— metode electroforetice.

Aceste metode sînt descrise mai pe larg în § 6.2.3.

Cînd se detectează prezenţa unor impurităţi peste limitele admisibile (de ex. 5% iod anorganic în compuşii anorganici marcaţi cu ^{125}I), se recomandă o nouă purificare a compusului, ceea ce măreşte în continuare durata lui de conservare.

3.4. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE

3.4.1. DEFINIŢIA PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

Deşi s-au scris mai multe monografii despre compuşii radiofarmaceutici [12, 14, 15, 61—65], deşi s-au ţinut simpozioane şi congrese pe această temă [8—11, 36, 39, 46, 66, 67], deşi există o revistă cu un comitet de redacţie internaţional, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, precum şi firme comerciale specializate în producerea acestor compuşi cu o importanţă crescîndă în practica medicală modernă, încă nu s-a ajuns la o definiţie unanim acceptată pentru compuşii radiofarmaceutici.

În accepţiunea strictă a acestui termen un produs radiofarmaceutic este definit ca [9, 11, 67—75] : (i) o substanţă radioactivă destinată a fi introdusă într-un organism uman în scopuri terapeutice sau de diagnostic, sau (ii) ca un medicament marcat radioactiv.

Ultima accepţiune trebuie pusă în legătură cu definirea medicamentului după Farmacopeea internaţională [13] : un medicament este orice substanţă sau amestec, fabricat, pus în vînzare sau prezentat pentru a fi folosit la :

— tratamentul, atenuarea, prevenirea ori diagnosticul unor boli, unor stări fizice anormale sau simptomelor acestora la om ori animal ;

— restaurarea, corectarea sau modificarea funcţiilor organice la om ori animal.

Există însă tendinţa lărgirii accepţiunii acestor definiţii prin excluderea surselor închise (folosite pentru terapia tumorilor), care nu sînt metabolizate în organism (de ex. surse de radiu, ace de ^{198}Au, ^{60}Co sau ^{192}Ir, comprimate sau suspensii ceramice de $^{90}Y_2O_3$), şi includerea în schimb a substanţelor radioactive destinate testelor *in vitro*. De aceea, în prezenta lucrare se descrie succint şi prepararea compuşilor marcaţi cu ^{14}C sau ^{3}H, care nu sînt compuşi radiofarmaceutici.

Rezultă că în farmacopei nu se vor include sursele închise, nici generatorii de radioizotopi ori trusele (completurile, „kit" în limba engleză sau „Besteck" în germană) ci doar soluţiile produse cu aceste truse.

3.4.2. CLASIFICAREA PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

După *forma farmaceutică*, se disting următoarele moduri de introducere în organismul uman [11, 72] :

A. Introducere orală :

a) Soluţii sau produse liofilizate în flacoane unidoză (de tip sticluţe de penicilină care evită măsurarea volumului şi contaminarea radioactivă,

chimică sau bacteriană) ori în flacoane multidoză (din care se extrage de fiecare dată o cotă parte). Ca solvent se utilizează apa, alcoolul diluat sau uleiul vegetal.

b) Capsule de gelatină umplute cu soluția măsurată pentru o singură doză. În stomac capsula se dizolvă, evitînd contaminarea radioactivă a pipetei, paharului, cavității bucale și esofagului.

B. Introducere parenterală :

a) Soluții sau produse liofilizate în flacoane unidoză sau multidoză, ca mai sus, dar respectînd prescripțiile de sterilitate, izotonicitate și apirogenie. Flacoanele multidoză au de obicei și adaos bactericid, de ex. alcool benzilic. Ca solvent se folosește apa sau alcoolul diluat, iar injecția se face în condiții aseptice.

b) Soluții în siringi unidoză, care după folosire se aruncă. Evită pericolul de contaminare bacteriană a soluției, transmiterea unor boli virale cum este icterul infecțios, precum și contaminarea radioactivă, reducînd la minim iradierea personalului medical.

c) Suspensii injectabile, soluții coloidale, micro- (0,5—1 μm diametru) și macroagregate (1—50 μm diametru) sau microsfere, în flacoane asemănătoare celor de la punctul A. a, de mai sus.

C. Introducere pe cale pulmonară :

a) gaze (de ex. ^{85}Kr și ^{135}Xe) în fiole de sticlă sau cilindri metalici. Pentru perfuzii, asemenea gaze se pot administra sub formă de soluție injectabilă.

b) aerosoli radioactivi.

După *destinația medicală*, produsele radiofarmaceutice se împart în :

A. Utilizare *in vivo* :

a) produse pentru radioterapie (de ex. surse de ^{192}Ir sau ^{198}Au, ori soluții de $Na^{131}I$) ; au, în general, activități mari de ordinul 10—100 mCi.

b) produse pentru diagnostic (majoritatea produselor radiofarmaceutice utilizate *in vivo*) ; au activități mici, de ordinul 10 μCi — 10 mCi.

B. Utilizare *in vitro:*

a) produse pentru radioimunodozări și alte teste *in vitro;* au activități foarte mici, de ordinul 1 — 100 μCi.

După *timpul de înjumătățire al radionuclidului*, compușii radiofarmaceutici se clasifică în :

1) produse radiofarmaceutice de viață scurtă ; nu există un consens pentru ceea ce se înțelege prin viață scurtă, dar A.P. Wolf a propus limita inferioară de 10 minute (^{13}N are $T_{1/2}$ de 10,2 min) și limita superioară de 2 zile [46]. Aceste produse radiofarmaceutice de viață scurtă sînt cele mai adecvate pentru diagnostic, durata lor de viață fiind comparabilă cu durata examenului clinic, și iradierea pacientului fiind redusă la minimum. Fiind în majoritate emițători β^+ sau γ, ele se prepară la ciclotron sau din generatori de radioizotopi și de aceea sînt și cele mai scumpe ;

2) produse radiofarmaceutice de viață medie, cuprinsă între 2 și 59 zile. Istoricește, ele au fost primele folosite pentru diagnostic și terapie, de ex. radioiodul-131. Ele sînt emițători β^+, β^- duri sau γ și se prepară la reactor, ciclotron sau cu generatori de radioizotopi ;

3) produse radiofarmaceutice de viață lungă, mai lungă de 60 zile ; ele sînt mai rar folosite clinic (^{125}I), cel mai adesea sînt utilizate pentru testări *in vitro* (^{125}I, ^{14}C, ^{3}H etc.). Pot emite orice fel de radiații și se prepară prin diferite metode.

Scanned with OKEN Scanner

După *operațiile chimice implicate*, produsele radiofarmaceutice se clasifică în :

1) preparate radioactive obținute prin iradierea unei ținte la reactor sau la ciclotron urmată de dizolvarea acesteia (de ex. $^{24}Na^+$, $^{42}K^+$, $^{82}Br^-$) ;

2) preparate radioactive obținute prin iradiere ca mai sus, urmată de prelucrare chimică (distilare, oxidare-reducere, purificare prin cromatografie, schimb ionic, dizolvare etc.). Acesta este cazul radiofarmaceuticelor anorganice cele mai obișnuite ($^{131}I^-$, $^{32}PO_4^{3-}$, $^{51}CrO_4^{2-}$, $^{35}SO_4^{2-}$) ;

3) preparate radioactive rezultate prin marcarea intrinsecă sau extrinsecă a unui compus organic cu ^{131}I, ^{125}I, cu ^{75}Se, ^{197}Hg, ^{203}Hg, ^{57}Co, ^{58}Co etc. ;

4) coloizi radioactivi, marcați cu ^{198}Au, ^{90}Y, ^{32}P, fie prin formarea unei suspensii coloide, fie prin marcarea unor microsfere gata preparate ;

5) radiofarmaceutice obținute cu ajutorul generatorilor de radioizotopi (de ex. ^{113m}In sau $^{99m}TcO_4^-$ sub formă de soluție eluată sau sub alte forme corespunzînd folosirii eluatului pentru marcări ca în punctele 3 și 4 de mai sus, eventual folosind truse speciale puse la dispoziție de producător).

3.4.3. PROBLEME SPECIALE ALE PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

Trecerea de la un compus marcat radioizotopic la un produs radiofarmaceutic cuprinde două aspecte : unul juridico-legal și altul de analiză chimică și biologică.

Atunci cînd, răspunzînd unei necesități, se descoperă un nou produs radiofarmaceutic, introducerea lui în practica medicală curentă cere parcurgerea următoarelor etape :

— experimentări în laborator, prin testări chimice și fizice pentru punerea la punct a unui procedeu de fabricare la gradul de puritate și reproductibilitate dorit ;

— experimentări farmacologice, prin determinarea eficienței, localizării, metabolizării și excreției, lipsa efectelor toxice cronice și acute, efectuate pe animale, pe culturi de țesuturi, pe organe. Totodată se pun la punct și testările biologice de sterilitate, netoxicitate, apirogenitate ;

— Comisia medicamentului și farmacovigilenței, la solicitarea producătorului, examinează documentația și dă avizul de necesitate, pe baza căruia se produce o mică cantitate pilot ;

— experimentarea clinică, sub îndrumarea și supravegherea Comisiei medicamentului și farmacovigilenței are ca scop testarea pe om (cu lot martor) a tuturor efectelor noului produs ;

— producătorul cere aceleiași comisii avizul terapeutic pe baza rezultatelor de mai sus, prezentînd și o schiță de proiect tehnologic, formele de condiționare, o cantitate prototip de produs, normele interne de control al calității produsului și aprecierea stabilității în timp a produsului (termenul de valabilitate sau durata de expirare). Experimentarea clinică durează 1—2 ani, se notează toate reacțiile pozitive sau adverse, și pe baza lor se dă sau nu avizul terapeutic ;

Scanned with OKEN Scanner

— după acordarea avizului terapeutic de către Comisie, pe baza şarjei zero sau a mai multor şarje (loturi) curente, se obţine de la Ministerul Sănătăţii avizul de fabricaţie ;

— Institutul pentru controlul de stat al medicamentului şi cercetării farmaceutice supraveghează calitatea şarjelor produse, prin testări independente de serviciul de control al calităţii din unitatea producătoare.

După o utilizare de cîţiva ani, preparatul se înscrie în Farmacopee sau într-unul din suplimentele ei, care apar la interval de aproximativ 3 ani.

În cazul omologării unor medicamente sau produse radiofarmaceutice din străinătate, etapele sînt asemănătoare.

Fiecare lot (şarjă) de produs radiofarmaceutic este testat chimic (puritate chimică), radioactiv (puritate radiochimică şi radionuclidică) şi biologic (netoxicitate, apirogenitate, sterilitate) în funcţie de utilizarea pe care o va avea (orală, parenterală, *in vitro*) şi de condiţiile de puritate înscrise în norma internă ori în Farmacopee. Aceste analize sînt descrise în amănunt în § 6.2.4.

La rîndul său, în clinică, medicul sau radiofarmacistul verifică de la caz la caz puritatea (cînd conservarea a fost mai îndelungată sau cînd prepararea a fost efectuată în spital, cum este cazul unor preparate folosind generatorii de radionuclizi), observă să nu se depăşească data de expirare înscrisă pe preparat, iar după folosirea preparatului radiofarmaceutic are grijă ca produsele de excreţie (urină, fecale) să fie colectate corespunzător (în special la folosirea terapeutică a unor radioizotopi de viaţă medie cum este ^{131}I).

În unele cazuri apar probleme specifice, de ex. faptul că la produsele radiofarmaceutice de viaţă scurtă nu se poate efectua testul de sterilitate decît în paralel cu, sau după administrarea produsului. Farmacopeele recunosc acest lucru şi, pînă la oficializarea unor teste de sterilitate mai rapide, este legiferată procedura descrisă mai sus.

Sub auspiciile OMS şi AIEA, au fost inserate în Farmacopeea internaţională *recomandări* privind o serie de produse radiofarmaceutice[13] :

Serumalbumină umană iodurată cu ^{125}I (injecţie)
Serumalbumină umană iodurată cu ^{131}I (injecţie)
Radiocromat de sodiu ^{51}Cr (injecţie)
Radioiodură de sodiu ^{131}I (injecţie)
Radioiodură de sodiu ^{131}I (soluţie)
Radioiodură de sodiu ^{125}I (soluţie)
o-Iodohipurat de sodiu ^{131}I (injecţie)
Radiofosfat de sodiu ^{32}P (injecţie)
Aur coloidal ^{198}Au (injecţie)
Cianocobalamină ^{57}Co
Cianocobalamină ^{58}Co
Citrat feric ^{59}Fe (injecţie)
Roz Bengal ^{131}I sodiu (injecţie)

Pentru România sînt *obligatorii* normele înscrise în Farmacopeea română, ediţia a 9-a [77] pentru următoarele produse radiofarmaceutice :

Radioiodură de sodiu ^{131}I (injecţie)
Radiocromat de sodiu ^{51}Cr (injecţie)
Radiofosfat de sodiu ^{32}P (injecţie)

Trebuie remarcat că în ediţia anterioară, a 8-a, Farmacopeea română conţinea cerinţe mai puţin stringente de puritate pentru $Na^{131}I$ şi $Na^{51}CrO_4$, care fuseseră conţinute ca soluţii, nu ca injecţii.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. K. Clusius, *Z. Elektrochem.*, **58**, 586 (1954).
2. A.T. Balaban, D. Fărcaşiu, F. Harary, *J. Labelled Comp.*, **6**, 211 (1970).
3. A. Murray III, D.L. Williams, „Organic Syntheses with Isotopes", Part I. cap. 1, p. 2, Interscience, New York, 1958.
4. C.J. Collins et al., „The nomenclature of organic compounds containing isotopic carbon", Raport ORNL—1084, US Atomic Energy Commission, Oak Ridge, 1961.
5. C.W. Sheppard, „Basic Principles of the Tracer Method, Introduction to Mathematical Tracer Kinetics", Wiley, New York, 1962, p. 282.
6. V.K. Iya, R.S. Mani, C.N. Desai, în „Radioisotope Production and Quality Control", Technical Reports Series Nr. 128, (editori A.T. Balaban, V.K. Iya, J.C. Maynard şi A.R. Palmer), IAEA, Viena, 1971, p. 823.
7. B.J. Wilson (editor), „The Radiochemical Manual", 2nd Ed., The Radiochemical Centre, Amersham, 1966, p. 31.
8. J.C. Charlton, în „Radioactive Pharmaceuticals" (Proc. Symp. Oak Ridge, 1965), editori G.A. Andrews, R.M. Kniseley şi H.N. Wagner, Jr., USAEC, p. 33.
9. Y. Cohen, *ibid.* p. 67.
10. W.H. Briner, *ibid.* p. 93.
11. Y. Cohen, în „Analytical Control of Radiopharmaceuticals" (editor A.T. Balaban), IAEA, Viena, 1970.
12. Y. Cohen, în „Radiopharmacy" (editori M. Tubis şi W. Wolf,) Wiley-Interscience, New-York, 1976, p. 379.
13. Organisation Mondiale de la Santé, „Spécifications pour le contrôle de la qualité des préparations pharmacéutiques", Pharmacopée Internationale, 2è Edition, Genève, 1967; Supplément 1971, p. 56.
14. W. Wolf, în „Radiopharmacy" (editori M. Tubis şi W. Wolf), Wiley-Interscience, New York, 1976, p. 206.
15. R.J. Bayly et al., *ibid.*, p. 303.
16. J.R. Catch, „Carbon-14 Compounds", Butterworths, London, 1961.
17. F. Weygand, H. Simon, „Houben-Weyl's Methoden der organischen Chemie", vol. 4, partea 2, p. 539, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1955.
18. H.R.V. Arnstein, în „Rodd's Chemistry of Carbon Compounds", 2nd Ed., (ed. S. Coffey), vol. 1, part A, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 148.
19. E.A. Evans, „Tritium and Its Compounds", Butterworths, London, 1966, p. 316; 2nd Ed., 1974.
20. M. Wenzel, P.E. Schulze, „Tritium-Markierung; Darstellung, Messung und Anwendung nach Wilzbach ^{3}H-markierter Verbindungen", W. de Gruyter Sc. Co., Berlin, 1962.
21. G. Wilzbach, „Gas exposure method for tritium labelling", în „Tritium in the Physical and Biological Sciences", vol. 2, p. 3; IAEA, Vienna, 1962.
22. J.C. Nevenzel et al., „Bibliography of Carbon-14", Report UCLA-316, p. 8 (1954).
23. M. Calvin et al., „Isotopic Carbon", Wiley, New York, 1949.
24. V.F. Raaen, G.A. Ropp, H.P. Raaen, „Carbon-14", McGraw-Hill, New York, 1968.
25. M. Bubner, L. Schmidt, „Die Synthese Kohlenstoff-14 markierter organischer Verbindungen", Verlag Georg Thieme, Leipzig, 1966.
26. G.G. Gusev, Yu M. Kapustin, „Tritii v organicheskoi khimii", Atomizdat, Moskva, 1966.
27. L. H. Szilard, T. A. Chalmers, *Nature* (*London*), **134**, 462, 494, (1934).
28. W. Herr, „Radiochemical Methods of Marking Organic Molecules", în „Proceedings of the Conference on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules", Brussels, Nov. 13—16, 1963. Euratom, Brussels, 1964, p. 151, 885.
29. G. Stöcklin, A. P. Wolf, „Reactions of energetic carbon with simple gaseous and liquid hydrocarbons", *ibid*, p. 181.
30. A. P. Wolf, „Recoil labeling of organic molecules with special reference to compounds of biological and biochemical significance", în „Preparation and Bio-medical Application of Labeled Molecules", Proceedings of Symposium in Venice, Euratom, Brussels, 1964, p. 423.
31. G. Stöcklin, „New aspects of recoil labeling (Review and prospects)", *ibid.*, p. 437.
32. A.P. Wolf, „Applied hot atom chemistry, labelling of compounds, and isotope production", în „Hot Atom Chemistry Status Report", IAEA, Vienna, 1975, p. 271.

Scanned with OKEN Scanner

33. A.P. Wolf, „Replacement events resulting from the ^{14}N (n, p) ^{14}C reaction in organic systems: statistical considerations and isotope distributions", în „Chemical Effects of Nuclear Transformations", IAEA, Vienna, 1961, vol. 2, p. 3.
34. E.F. Simonov, An. N. Nesmeyanov, „Reakţia goryacih atomov tritia s aminokislotami", în „Chemical Effects of Nuclear Transformations" IAEA, Vienna, 1965, vol. 1, p. 411.
35. W.L. Hughes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **70**, art. 13 (1957).
36. W.M. Hunter, în „Radioactive Pharmaceuticals", (Proc. Symp. Oak Ridge 1965), editori G.A. Andrews, R.M. Kniseley, H.N. Wagner Jr., USAEC, Oak Ridge 1965, p. 245.
37. V. Bocci, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **15**, 449 (1969).
38. U. Rosa et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **86**, 519 (1964).
39. M. Tubis, în „Radioactive Pharmaceuticals" (Proc. Symp. Oak Ridge, 1965), editori G.A. Andrews, R.M. Kniseley, H.N. Wagner Jr., USAEC, Oak Ridge, 1966, p. 281.
40. C.T. Flear, I.G. Graber, *Clin, Chim. Acta*, **8**, 333 (1963).
41. C.N. Desai, N.M. Lebre, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **19**, 157 (1968).
42. R.S. Gordon, *J. Polym. Sci. USSR*, **31**, 192 (1958).
43. J.A. Ravin, A.M. Seligman, *New Engl. J. Med.*, **247**, 921 (1952).
44. A.E. Johnson, B. Hartley, F. Colland, *J. Nucl. Med.*, **8**, 97 (1967).
45. I. Gălăţeanu, C. Bratu, *J. Labelled Comp. and Radiopharm.*, **13**, 256 (1977); I. Gălăţeanu, M. Roman, I. Zamfir, V. Lungu, C. Uncuţa, G. Fodor, *J. Radioanalyt. Chem.*, **26**, 189 (1975); C. Bratu, G. Bratu, I. Gălăţeanu, M. Roman, *ibid.*, **26**, 5 (1975); I. Gălăţeanu, C. Bratu, A. Petride, *Radiochem. Radioanalyt. Letters*, **28**, 95 (1977).
46. A.P. Wolf et al., în „Radiopharmaceuticals and Labelled Compounds", vol. 1, p. 345, IAEA, Vienna, 1973.
47. A.P. Wolf, C.S. Redvanly, „Carbon-11 and Radiopharmaceuticals", Report BNL — 21411, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, 1976.
48. R.M. Lambrecht, A.Atkins, H. Elias, J.S. Fowler, S.S. Lin, A.P. Wolf, *J. Nucl. Med.*, **15**, 863 (1974).
49. A.N. Ansari, H. Atkins, R.M. Lambrecht, C.S. Redvanly, A.P. Wolf, Symp. IAEA, 185.
50. B.M. Tolbert et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1867 (1953).
51. P. Rochlin, *Chem. Revs.*, **65**, 685 (1965).
52. M.R. Kirk, R.M. Lemman, R.M. Noller, R. Ostwald, M. Calvin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1867 (1953).
53. B.M. Tolbert, „Proc. Conf. on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules", Brussels, 1963, EURATOM, p. 575 (1964).
54. B. M. Tolbert, M.H. Krinks, C.O. Stevens, *ibid.*, p. 671.
55. S. Apelgot, B. Ekert, M.R. Tisne, *ibid.*, p. 939.
56. R.J. Bayly, H. Weigel, *Nature*, **188**, 384 (1969).
57. B. M. Tolbert, „Advances in Tracer Methodology" (ed. S. Rothchild), Plenum Press, New York 1963, p. 64.
58. R.J. Bayly, J.R. Catch, „The Stability of Labelled Organic Compounds", Review 3, The Radiochemical Centre, Amersham, 1968.
59. J.R. Catch, „The Stability of Labelled Organic Compounds", The Radiochemical Centre, Amersham, 1967.
60. R.J. Bayly, E.A. Evans, „Storage and Stability of Compounds Labelled with Radioisotopes", The Radiochemical Centre, Amersham, 1968; *J. Labelled Comp.*, **2**, 1 (1966); **3**, 349 (1967).
61. M. Tubis, în „Radioactive Tracer and Radiopharmaceuticals" (ed. N.H. Blahd), McGraw Hill, New York, 1965, p. 143.
62. J.L. Rabinowitz, G.A. Bruno, în Topics in Medicinal Chemistry" (ed. J.L.Rabinowitz, şi R.M. Meyerson), Interscience, New York, 1967.
63. W.R. Hendee, „Radioactive Isotopes in Biological Research", Wiley, New York, 1973.
64. H.N. Wagner Jr., B.A. Rhodes, în „The Principles of Nuclear Medicine" (H.N. Wagner, Jr., ed.), Saunders, Philadelphia, 1968, p. 6.
65. J.F. Duncan, G.B. Cook, „Isotopes in Chemistry", Clarendon Press, Oxford, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

66. J.G. Mc Afee, în „Radiopharmaceuticals" (Symp. Atlanta, 1974), editori G. Subramanian, B.A. Rhodes, J.F. Cooper, V.J. Sodd, Soc. Nuclear Medicine, New York, 1975, p. 3.
67. Y. Cohen, în „Preparation and Control of Radiopharmaceuticals from Generator Produced Radionuclides", May 11—15, 1970, IAEA, Vienna.
68. W. Wolf, M. Tubis, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 1 (1967).
69. K. Kristensen, *Acta Radiologica*, Suppl. 254, 131 (1966).
70. N. G. Gopal, V. K. Iya, *J. Scient. Industr. Res.*, **26**, 153 (1967).
71. R.S. Mani, N.G.S. Gopal, în „Radiopharmacy" (editori M. Tubis și W. Wolf), Wiley-Interscience, New York, 1976, p. 502.
72. M. Tubis, *ibid.*, 410.
73. R.J. Bayly, în „Radioactive Pharmaceuticals" (Proc. Symp. Oak Ridge, 1965), editori G.A. Andrews, R.M. Kniseley și H.N. Wagner Jr., USAEC, Oak Ridge, 1966, p. 54.
74. I. Gălățeanu, A.T. Balaban, *Progresele științei*, **9**, 493 (1973).
75. W. Wolf, A.T. Balaban, *IAEA Bulletin*, **13**, 13 (1971).
76. A.T. Balaban, în „Segunda Conferencia Interamericana de Radioquimica", Mexico City, 22—25 Apr. 1968, Washington, 1971, p. 10.
77. Farmacopeea română, ed. a 9-a, Edit. medicală, București, 1976.

Capitolul 4

OBȚINEREA COMPUȘILOR MARCAȚI CU RADIOIZOTOPI

Prepararea compușilor marcați cu radioizotopi include folosirea unor metode specifice de marcare : sinteză, biosinteză, schimb izotopic, substituție, complexare, recul și altele. Radioizotopii necesari acestei preparări sînt obținuți prin metodele descrise în cap. 2.

4.1. GAZE RARE

Pînă nu de mult, cele 6 elemente (He, Ne, Ar, Kr, Xe, Rn), cunoscute sub denumirea de gaze rare (nobile), erau considerate, din punct de vedere chimic, inerte. Aceasta s-a datorat faptului cunoscut că elementele a căror structură electronică conține nivele energetice exterioare cu un număr de 8 electroni (cu excepția He care are în total 2 electroni) prezintă o stabilitate chimică maximă, nereacționînd cu alte elemente. De asemenea, caracterul inert al acestor elemente se datorează potențialului de ionizare înalt determinat de configurația lor electronică.

După obținerea în 1962 [1] a primului compus chimic al xenonului, $XePtF_6$, cercetările întreprinse au fost încununate de rezultate surprinzătoare fiind obținuți noi compuși ai unor gaze nobile ca : fluoruri de Xe, Kr și Rn, oxizi de Xe și Kr, săruri sub formă de xenați, perxenați, kriptonați și o serie de compuși complecși cu fluor ai xenonului și kriptonului [2 —15].

Față de celelalte gaze nobile, xenonul are, pînă în prezent, cei mai mulți compuși chimici obținuți, pe cînd kriptonul are doar cîteva fluoruri. Heliul, neonul și argonul, cu toate încercările făcute în condiții foarte severe de reacție, au rămas inerte nereacționînd cu fluorul.

Amintim că dintre compușii xenonului obținuți pînă în prezent sînt următorii [16 —18] :

a) compuși cu fluor : XeF_2, XeF_4, XeF_6, XeF_8,

b) compuși cu oxigen : XeO_3 (foarte exploziv) ; XeO_4(oxizi), $XeOF_2$, $XeOF_4$(oxofluoruri), Ba_2XeO_6 ; $Na_4XeO_6 \cdot 6H_2O$, (oxoxenați) etc. ;

c) compuși cu clor și brom : $XeCl_2$, $XeCl_4$ și $XeBr_2$, $XeBr_4$,

d) compuși cu metale : $XeF_2 \cdot 2SbF_5$; $XeF_2 \cdot 2NbF_5$; $XeF_2 \cdot 2TaF_5$ etc. ;

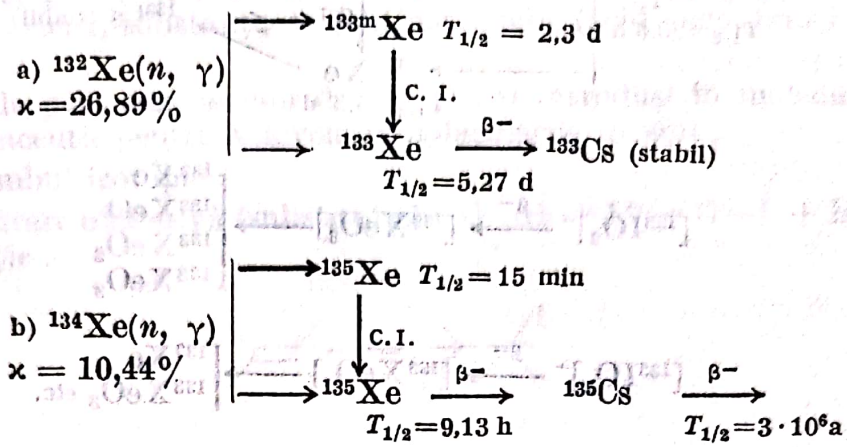
e) clatrați : $Xe \cdot 6H_2O$;

f) complecși anionici : $HXeO_6^{3-}$, $H_2XeO_6^{2-}$, $H_3XeO_6^{-}$.

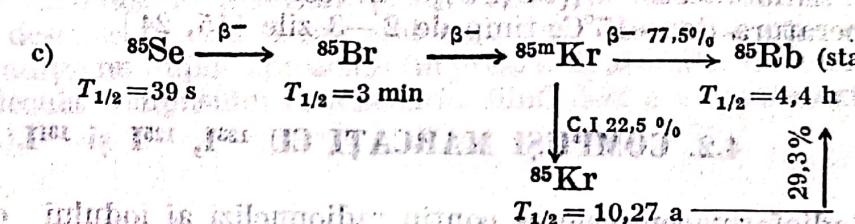
Dintre gazele nobile pînă în prezent o aplicație curentă în medicină și-au găsit xenonul și kriptonul (^{127}Xe, ^{133}Ye, ^{135}Xe și ^{85}Kr) ca trasori

biologici pentru studii de ventilaţie pulmonară şi determinări de debit sanguin regional (cerebral, pulmonar, muscular, miocardial etc.).

Radionuclizii ^{133}Xe şi ^{135}Xe se obţin prin iradiere cu neutroni a amestecului natural de xenon, conform schemei :



Radionuclidul ^{85}Kr se obţine din produşii de fisiune ai uraniului, conform schemei :



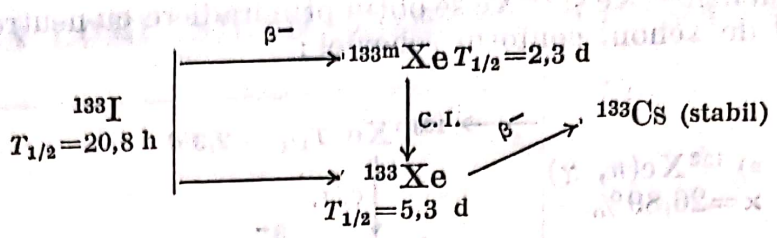
Obţinerea compuşilor marcaţi cu xenon radioactiv se poate realiza prin mai multe metode, dintre care menţionăm [19] :

a) Metode directe de sinteză, în care compuşii marcaţi cu xenon radioactiv se realizează prin sinteze chimice obişnuite folosind componente organice sau anorganice între care şi una ce conţine radionuclidul ^{133}Xe sau ^{135}Xe. În calitate de produs intermediar radioactiv în sinteza compuşilor marcaţi ai xenonului se folosesc fluorurile : $^{133}XeF_2$ sau $^{133}XeF_4$ şi $^{135}XeF_4$. Sinteza acestor fluoruri are loc în instalaţii adecvate acestui gen de lucrări.

b) Metode de sinteză bazate pe efectele chimice ale transformărilor nucleare : reacţii (n, γ), dezintegrarea β a radionuclizilor iodului sau a tranziţiilor izomerice.

În acest scop se iradiază cu neutroni $(5 \cdot 10^{12} - 10^{13}$ n/cm². s în reactorul nuclear cantităţi de ordinul 50 —300 mg de XeF_2 sau XeF_4 în fiole de cuarţ, timp de 24 — 72 ore, la temperaturi ce nu depăşesc 70°C. Se induce astfel radioactivitate în cristalele de di- şi tetrafluorură de xenon prin formarea radionuclizilor ^{125}Xe şi ^{133}Xe. După un timp de răcire de circa 8 — 10 zile activitatea preparatului este atribuită perechii izomere ^{133m}Xe — ^{133}Xe deoarece ^{125}Xe avînd $T_{1/2}$ = 18 h s-a dezintegrat total. Retenţia xenonului radioactiv în cristale de di- şi tetrafluoruri este de circa 90% [20, 21].

Dezintegrarea β a unor radionuclizi ai iodului poate conduce la obținerea de compuși marcați cu xenon radioactiv, conform reacțiilor [22,23]:



$$[^{133}IO_3]^- \xrightarrow{\beta^-} [^{133}XeO_3] \longrightarrow \begin{bmatrix} ^{133}Xe \\ ^{133}XeO \\ ^{133}XeO_2 \\ ^{133}XeO_3 \end{bmatrix}$$

$$[^{133}IO_4]^- \xrightarrow{\beta^-} [^{133}XeO_4] \longrightarrow \begin{bmatrix} ^{133}Xe \\ ^{133}XeO_3 \text{ etc.} \end{bmatrix}$$

De asemenea, tranzițiile izomerice pot fi folosite cu succes la marcarea compușilor cu xenon radioactiv. În acest mod s-au obținut compuși de xenon marcați cu ^{133}Xe prin punerea în contact a izomerului respectiv cu anhidrida acidului trifluoracetic — $((CF_3CO)_2O)$ în recipiente sub presiune 10 —20 atm, la temperatura de —15°C, timp de 2 —3 zile [15, 24].

4.2. COMPUȘI MARCAȚI CU ^{123}I, ^{125}I și ^{131}I

Radiofarmaceuticele ce conțin radionuclizi ai iodului ocupă un loc important în medicina nucleară atît în studiile de metabolism și dinamice cît și în diagnostic. De asemenea, crește necontenit utilizarea lor pentru dozarea *in vitro* a unor compuși biologici și în determinările imunologice. În acest scop metodele de marcare a radiofarmaceuticelor cu radionuclizi ai iodului vor purta amprentele unor caracteristici ce le deosebesc prin condițiile impuse de conservare a integrității biologice a compusului marcat. Astfel, comportamentul biologic al unui produs radiofarmaceutic poate fi determinat de felul marcării lui: intrinsecă sau extrinsecă, marcarea intrinsecă fiind ideală. Radionuclidul poate fi astfel ales încît el să facă parte integrantă din procesul metabolic, fiind un produs ce intră în componența (structurală sau funcțională) a organului respectiv, și care să poată fi marcat radioactiv. Astfel de produse sînt hormonii tiroidieni (tiroxina și triiodotironina) care inițial conțin atomi de iod în structura lor chimică și permit o marcare cu iod radioactiv. În acest caz, marcarea radioactivă a compusului respectiv nu alterează sau nu diminuează „integritatea biologică" a acestuia și ca atare în organism el se comportă identic ca și compusul nemarcat. Deoarece numărul compușilor biologici ce pot fi marcați intrinsec este destul de redus, majoritatea produselor radiofarmaceutice sînt marcate extrinsec prin introducerea unui „atom străin" de iod în structura acestor compuși. Cu toate acestea, s-a observat că atunci cînd molecula unui produs radiofarmaceutic, mai ales a celor cu greutate moleculară mare (peste 10000), nu conține mai mult de 1 atom de iod (radioactiv sau stabil) comportamentul lor biologic este satisfăcător, avînd o perioadă biologică relativ scurtă și nu sînt toxici. Printre compușii

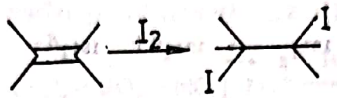
radiofarmaceutici marcaţi extrinsec cu radionuclizi ai iodului amintim următorii : proteine din plasma sanguină (serumalbumină umană, macro- şi microagregate, globuline, fibrinogen etc.), hormoni proteici (insulină, hormonul de creştere, hormonul adrenocorticotropic, hormonul paratiroid, hormonul de stimulare a tiroidei etc.), anticorpi, antigene, baze pirimidinice şi purinice, hormoni estrogeni şi androgeni, peptide şi polipeptide, aminoacizi, substanţe de contrast, lipide (acid oleic, trioelină etc.) şi mulţi alţii.

Reacţiile prin care atomii de iod pot fi introduşi în molecula unui compus farmaceutic pentru a deveni radiofarmaceutic sînt :

— schimbul izotopic

— iodurare oxidativă (substituţie) : $C-H + I^+ \rightarrow C-I + H^+$

— adiţie :



Marcarea cu iod radioactiv prin schimb izotopic implică prezenţa unuia sau mai multor atomi de iod neradioactiv în molecula compusului respectiv, fiind deci o marcare intrinsecă (izotopică). Atomii de iod neradioactivi pot fi introduşi în moleculă prin sinteză sau prin alte metode de încorporare descrise în cap. 3 sau sînt endogeni. Marcarea prin iodurare oxidativă şi adiţie nu implică prezenţa (în prealabil) atomilor de iod neradioactiv în molecula compusului farmaceutic, fiind deci o marcare extrinsecă (neizotopică).

4.2.1. MARCAREA CU IOD RADIOACTIV PRIN SCHIMB IZOTOPIC

O serie de compuşi organici din clasele şi grupele celor amintiţi mai sus care în structura lor conţin atomi de iod atît endogeni cît şi estrogeni în poziţie specifică se pot marca cu radionuclizi ai iodului prin metoda schimbului izotopic. Radionuclidul respectiv, în majoritatea cazurilor, se află în formă chimică de iodură de sodiu (fără purtător, agenţi reducători sau stabilizatori) cu activitate specifică înaltă şi o concentraţie radioactivă de 10—100 mCi/ml.

Deoarece schimbul izotopic, în acest caz, are loc între un atom de iod neradioactiv aflat în compusul respectiv într-o poziţie specifică oarecare, legat direct de nucleul benzenic, ciclul penta, nucleul pirimidinic sau ciclul pirolidonă etc., şi cu un atom radioactiv al iodului (^{123}I, ^{125}I, ^{131}I), ultimul trebuie să se afle în aceeaşi formă de valenţă (stare oxidată) ca şi primul. Iodul radioactiv din iodura de sodiu fiind în forma chimică I^- nu poate intra în reacţia de schimb izotopic ci numai în formele I^0 şi I^+ fapt pentru care acesta trebuie oxidat. În acest scop în calitate de oxidant de obicei se utilizează apa oxigenată, iodatul de potasiu sau cloramina-T. De asemenea, iodul radioactiv din iodura de sodiu poate fi trecut în formă oxidată şi pe cale electrochimică. Această metodă se utilizează în ultimul timp tot mai des pentru marcarea proteinelor şi a unor compuşi biologici uşor

Scanned with OKEN Scanner

degradabili. Metodele de iodurare cu cloramină-T și cea electrochimică fiind metode directe de iodurare, acestea se folosesc cu preponderență la iodurarea prin reacția de substituție și mai puțin prin cea de schimb izotopic. În unele cazuri ca agent de iodurare radioactivă este folosită și monoclorura de iod.

a) *Metoda cu iodură și iodat.* Randamentul de utilizare a iodului radioactiv, în acest caz, este de maximum 50%, deoarece în iodul molecular $^{131}I_2$ numai un atom este propice marcării:

$$^{131}I^- + IO_3^- + 6[H^+] \rightleftarrows 3\,^{131}I_2 + 3H_2O$$

$$3\,^{131}I_2 + 3H_2O \rightleftarrows 3\,HO^{131}I + 3\,H^+ + 3\,^{131}I^- \qquad (4.1)$$

$$KI + {}^{127} + {}^{131}I_2 \rightarrow KI\,{}^{127+131}I_2 \qquad (4.2)$$

$$^{131}I_2 \rightleftarrows {}^{131}I^{\delta+} - {}^{131}I^{\delta-}$$

$$^{131}I^{\delta+} - {}^{131}I^{\delta-} + R - {}^{127}I \rightleftarrows R - {}^{131}I^{\delta+} + {}^{127}I - {}^{131}I^{\delta-} \qquad (4.3)$$

Reacția de schimb izotopic decurge cu randament maxim la cald în condiții de pH cuprinse între 5 și 6, și 90 — 100°C timp de 2—3 ore. S-a observat că iradierea probei cu un flux de lumină de la o lampă de 200 wați sau UV produce o creștere considerabilă a randamentului de marcare atingînd 100%.

b) *Metoda cu ICl.* Aplicînd această metodă la marcarea cu iod radioactiv a compușilor organici, utilizarea acestuia poate atinge randamentul maxim de 100% dat fiind că atomii de iod din molecula de ICl se află oxidați în forma I^+. Monoclorura de iod neradioactiv necesară pentru marcări se prepară conform reacției stoechiometrice:

$$6\,HCl + 2I^- + IO_3^- \rightleftarrows 3\,ICl_2^- + 3H_2O \qquad (4.4)$$

Diluînd produsul de reacție în proporția de 1/27,6 cu o soluție de NaCl 2M se obține în final soluția de ICl de concentrație 0,1104 M sau 4 micromoli/ml și 0,0579 M în HCl.

Pentru marcare, monoclorura de iod neradioactiv este necesar a fi trecută în prealabil în forma radioactivă prin echilibrare cu iodură de sodiu radioactivă în mediu acid ori slab acid conform reacției de schimb izotopic:

$$ICl + Na^{131}I \xrightarrow{[H^+]} {}^{131}ICl + NaCl + HI \qquad (4.5)$$

În mediu alcalin monoclorura de iod radioactiv este hidrolizată cu formare de acid hipoiodos:

$$^{131}ICl + NaOH \rightarrow HO^{131}I + NaCl \qquad (4.6)$$

Ambele reacții decurg foarte rapid, furnizînd ca agenți de iodurare, în mediu slab acid, ^{131}ICl iar în mediu alcalin, $HO^{131}I$.

Acidul hipoiodos în mediu alcalin disproporționează conform reacției:

$$3\,HO\,{}^{131}I + 3\,OH^- \rightarrow 2\,{}^{131}I^- + IO_3^- + 3H_2O$$

ceea ce produce o scădere a eficienței de iodurare. Pentru a împiedica această disproporționare, este necesar ca în sistem să fie un mic exces de ICl și un pH slab acid, în mediu de HCl favorizînd astfel reacția :

$$3HO^{131}I + 3H^+ + 3Cl^- \rightleftarrows 3^{131}ICl + 3H_2O \qquad (4.7)$$

c) *Metoda cu cloramină-T.* Spre deosebire de iodurarea prin metodele descrise mai sus care sînt mai dure, putînd altera comportamentul biologic al compusului marcat, metoda de iodurare cu cloramină-T (sarea de sodiu a N-monoclor-*p*-toluensulfonamidei, este mai puțin dură, deoarece agentul de oxidare este un oxidant de categorie medie, care în mediu apos, încet, pune în libertate acid hipocloros. Această caracteristică pozitivă recomandă ca metoda în special să fie frecvent utilizată pentru marcarea cu iod radioactiv (^{123}I, ^{125}I și ^{131}I) a proteinelor.

Reacțiile de oxidare a iodului în acest caz sînt, probabil, următoarele :

$$[p\text{-}H_3C-C_6H_4-SO_2-NCl]^-Na^+ \xrightarrow{H_2O} HOCl \qquad (4.8)$$

$$2Na^{131}I + HOCl \rightarrow {}^{131}ICl + {}^{131}IOH + 2Na^+ \qquad (4.9)$$

Încorporarea iodului radioactiv în proteine are loc cu randament maxim în intervalul de pH = 7—8 și cu un exces de cloramină-T luat în proporție de circa 10 μg la 1 μg de proteină ; atunci cînd se raportează la iodura de sodiu radioactiv fără purtător și agenți reducători ori de stabilizare această proporție este de circa 50 μg la 1 mCi Na ^{131}I. O creștere a cantității de cloramină-T nu duce la creșteri considerabile ale randamentului de marcare a proteinelor, iar în unele cazuri excesul de oxidant poate avea efecte negative asupra integrității biologice a acestora. Funcție de sensibilitatea biologică a compușilor respectivi la care marcarea cu iod radioactiv nu trebuie să depășească în medie 0,5—1 atom de iod per moleculă, cantitatea de oxidant trebuie redusă, sau se reduce la 20 s timpul de contact al proteinei cu oxidantul.

S-a observat că stocarea cloraminei-T timp îndelungat (peste 0,5—1 an) provoacă o diminuare considerabilă a capacității sale de oxidare. În acest caz cantitatea de oxidant introdusă în sistem poate fi mărită uneori cu 100 %, ținînd seamă că pentru a obține o oxidare aproape totală a iodului este necesar în acest caz un exces de oxidant luat în proporție de 150—200 molecule de cloramină-T la o moleculă de $Na^{131}I$, uneori chiar mai mult.

Oprirea reacției de iodurare se realizează prin introducerea în sistem a unei cantități echivalente de metabisulfit de sodiu, în proporție de 1,50 μg la 1 μg cloramină-T.

Marcarea cu ^{131}I a compușilor farmaceutici prin metoda schimbului izotopic permite obținerea de activități specifice înalte și totodată o marcare într-o poziție stabilită.

d) *Metoda electrochimică.* Marcarea proteinelor cu iod prin metoda electrochimică, în comparație cu alte metode, asigură într-o măsură mai mare integritatea biologică a moleculei proteice. Acest fapt a determinat ca metoda electrochimică să devină o metodă curentă de marcare a proteinelor cu iod radioactiv, fiind simplă și accesibilă în special laboratoarelor de spital, în care utilizarea produsului se face pe loc (in house).

Practic, marcarea se realizează într-o celulă electrolitică (vas cilindric de sticlă), cu o capacitate de 15—50 ml în care se introduce o

anodă de platină de formă cilindrică cu o suprafață de 10—30 cm^2 ; o catodă care este separată de compartimentul anodei printr-o membrană de dializă. Anoda și catoda sînt alimentate cu curent continuu de intensitate ce variază de la compus la compus, fiind cuprinsă în multe cazuri, între 0,1 și 5,0 mA, fiind măsurată cu ajutorul unui ampermetru. Pentru a evita acumularea de iod liber în sistem (soluție), se recurge la folosirea unei intensități a curentului sub 1 mA. Funcție de stabilitatea chimică a fiecărui compus, se reglează pH-ul astfel ca încorporarea iodului radioactiv în compusul radiofarmaceutic să fie optimă, folosind în acest scop soluție tampon, de pH dorit.

Descrierea metodei de marcare electrochimică a proteinelor cu iod radioactiv, este dată în lucrarea [421 a].

4.2.2. METODA DE MARCARE PRIN SUBSTITUȚIE

Halogenarea compușilor aromatici, a unor compuși alifatici, amino-acizi, polipeptide și proteine adeseori se face prin metoda substituției electrofile. În aceste cazuri grupa incidentă X (atomii sau moleculele de halogeni) este un reactant electrofil, de cele mai multe ori un ion pozitiv, sau uneori molecule neutre.

Marcarea cu iod radioactiv a acestor compuși prin substituție electrofilă are loc conform ecuațiilor generale :

$$Ar-H + X^+ \rightarrow Ar-X + H^+ \qquad (4.10)$$

$$R-M + X^+ \rightarrow R-X + M^+ \qquad (4.11)$$

în care ArH reprezintă compusul aromatic, R un compus alifatic sau alt gen de compus (nearomatic) care are în structura sa grupa M și care poate fi un proton, ion metalic, halogen pozitiv etc., iar X un atom sau moleculă de halogen.

Reacția de substituție are loc în două etape consecutive :

a) formarea speciei active electrofile, a iodului prin una din reacțiile de oxidare menționate în paragraful precedent,

b) reacția de substituție propriu-zisă.

Așa cum s-a arătat mai sus, speciile active electrofile ale iodului pot fi I_2^0, I^+ și I^0, care se obțin în final prin reacții de oxidare în soluție cu oxidanții menționați mai sus.

În mediu slab acid, acidul hipoiodos reacționează cu compușii aromatici cu o viteză comparabilă. Cinetica reacției este descrisă de relația :

$$v = k[ArH]\,[HOI]\,[H^+] \qquad (4.12)$$

sau atunci cînd compusul aromatic are o reactivitate mare, viteza de iodurare depinde numai de concentrația acidului hipoiodos, iar relația (4.12) devine :

$$v = k[HOI] \qquad (4.13)$$

Din cele expuse mai sus rezultă că reactantul electrofil propriu-zis este acidul hipoiodos (sau acidul conjugat al acestuia) ori ionul pozitiv de iod format prin ruperea acestuia, conform reacției :

$$H-O-I + H^+ \rightleftarrows H-\overset{+}{\underset{|}{O}}\underset{H}{}-I \rightleftarrows H_2O + I^+ \qquad (4.14)$$

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește mecanismul de iodurare a compușilor aromatici, prin substituție electrofilă, în prezent există dovezi experimentale că următoarele două căi ar fi posibile :

a) iodurarea are loc prin substituție electrofilă în care predomină un mecanism de deslocuire directă, cu formarea unei stări de tranziție :

$$Ar-H + I^+ \rightarrow Ar\begin{matrix}\diagup I^+ \\ \diagdown H\end{matrix} \rightarrow Ar-I + H^+ \qquad (4.15)$$

b) iodurarea are loc prin substituție electrofilă în două etape, prima fiind adiția reactantului electrofil, adică a ionului pozitiv de iod, la nucleul aromatic formînd un intermediar instabil, urmată de a doua etapă în care acest intermediar elimină un proton pe care-l cedează mediului de reacție :

$$Ar-H + I^+ \rightleftarrows Ar^+\begin{matrix}\diagup H \\ \diagdown I\end{matrix} \rightarrow Ar-I + H^+ \qquad (4.16)$$

Măsurătorile cinetice ale reacției de deuterare a benzenului și a altor compuși aromatici au demonstrat că substituția electrofilă aromatică decurge, după toate probabilitățile, conform mecanismului arătat în relația (4.16) și că legătura nouă Ar—X se formează înaintea ruperii legăturii Ar—H.

Oxidarea iodului, necesară reacției de substituție se realizează folosind agenți de oxidare, ca de exemplu cloramina-T, mai rar monoclorura de iod și frecvent oxidarea electrochimică.

4.2.3. METODA MARCĂRII PRIN ADIȚIE LA DUBLA LEGĂTURĂ

În general se știe că halogenii adiționează la dubla legătură alchenică, formînd combinații halogenate prin legarea atomilor de halogeni de atomul de carbon, conform reacției :

$$-CH=CH- + X_2 \rightarrow -CHX-CHX- \qquad (4.17)$$

care are loc la temperatura camerei și presiune normală. Deoarece dintre toți halogenii iodul adiționează la dubla legătură cel mai greu, reacția de adiție a iodului decurge cu randament mai mare numai sub acțiunea luminii ultraviolete pentru a ridica starea energetică a sistemului pe nivele superioare favorabile acestei reacții. Dacă halogenul se află sub formă de hidracid, acesta adiționează la dubla legătură, formînd monohalogeni-alcani; dintre hidracizii halogenilor cel mai ușor reacționează acidul iodhidric :

$$CH_2=CH_2 + HI \rightarrow CH_3-CH_2I \qquad (4.18)$$

Adiția iodului la dubla legătură alchenică într-o măsură mai mică decît ceilalți halogeni, se datorește reversibilității reacției :

$$R_2C=CR_2 + I_2 \rightleftarrows IR_2C-C^+R_2 + I^- \qquad (4.19)$$

Scanned with OKEN Scanner

în care în primul stadiu, echilibrul este mult deplasat spre stînga. Un exemplu de marcare cu iod radioactiv prin reacţia de adiţie la dubla legătură este marcarea unor polizaharide, ca inulina, folosită în determinarea funcţiei renale (glomerulare) şi a apei extracelulare din organismul uman :

a) reacţia inulinei cu bromura de alil pentru a forma esterul alil-inulin :

$$CH_2{=}CH{-}CH_2Br + R{-}OH \rightarrow CH_2{=}CH{-}CH_2{-}O{-}R + HBr \qquad (4.20a)$$

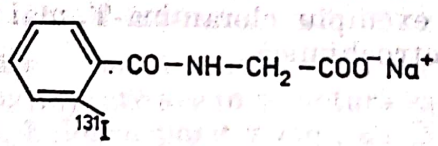
b) adiţia iodului radioactiv :

$$CH_2{=}CH{-}CH_2{-}O{-}R + I_2^* \rightarrow CH_2I^*{-}CHI^*{-}CH_2{-}O{-}R \qquad (4.20b)$$

unde R este radicalul inulin.

4.2.4. COMPUŞI RADIOFARMACEUTICI MARCAŢI CU IOD RADIOACTIV ŞI TEHNICI DE MARCARE

4.2.4.1. Acidul o-iod ohipuric (N-o-iodobenzoilglicină)



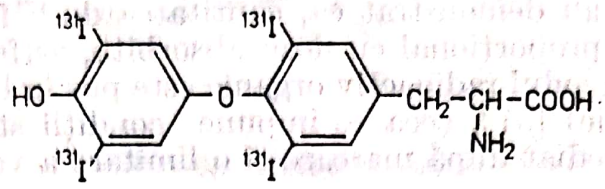
Acidul *o*-iodohipuric sau sarea de sodiu a acestuia, denumită comercial hipuran, se utilizează frecvent în medicina nucleară sub formă de soluţie injectabilă, pentru diagnostic în determinarea funcţiei renale.

Marcarea acidului *o*-iodohipuric sau a sării de sodiu cu ^{131}I se face prin metoda schimbului izotopic [25—31] după cum urmează : într-un volum de 1,5 ml soluţie apoasă de *o*-iodohipurat de sodiu de concentraţie 240 mg/ml se introduce o cantitate determinată de iodură de sodiu-^{131}I fără purtător şi agent reducător cu o activitate totală de 5—25 mCi (circa 0,2 0,5 ml) precum şi cîteva picături de soluţie de iodat de potasiu 0,2%. Se ajustează pH-ul la 5,6 cu HCl 0,5 N şi apoi vasul de reacţie se închide ermetic şi se încălzeşte pe baia de apă sub un flux de lumină de la un bec de 150—200 waţi (la distanţa de 15 cm), timp de 90 min. După expirarea timpului de încălzire, în vasul de reacţie se introduc 3—4 picături de $Na_2S_2O_3$ 0,1 M şi se agită conţinutul vasului oprind astfel procesul de iodurare prin trecerea $^{131}I^+$ în $^{131}I^-$. Funcţie de conţinutul de $^{131}I^-$ liber soluţia radioactivă de *o*-iodohipurat de sodiu se purifică de radioiodura liberă prin precipitare în mediu de HCl (pH = 1), prin filtrare pe coloană umplută cu anioniţi (Dowex-1 sau Amberlit IRA—400) sau prin contactare cu un amestec de precipitate format din iodură şi clorură de argint, urmată de filtrare sau centrifugare pentru separarea produsului final [32—40]. După ajustarea p-H-ului la 6—8 produsul final se sterilizează prin autoclavare sau filtrare Millipore.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.4.2. **Hormoni tiroidieni-^{131}I (^{125}I):** Se vor descrie tetra- şi triiodotironina, precum şi mono- şi diiodotirosina.

Tiroxina-^{131}I (tetraiodotironina) şi triiodotironina-^{131}I. Tiroxina marcată cu ^{131}I sau ^{125}I este utilizată în studiul metabolismului şi transportului tiroxinei endogene în medicină *in vivo*. De asemenea este folosită şi pentru determinarea naturii şi a cantităţii de tiroxină legată de proteinele plasmatice *in vitro*



(4.21)

Funcţie de numărul de atomi de iod neradioactiv introduşi prin sinteză în cele două nuclee benzenice, structura chimică de mai sus poate conţine 3 sau 4 atomi de iod neradioactiv, care prin metoda schimbului izotopic pot fi parţial sau total înlocuiţi cu atomi de iod radioactiv (^{131}I sau ^{125}I). Cînd în structura chimică există 3 atomi de iod în poziţiile 3, 5, 3′ acesta se identifică cu un alt hormon tiroidian—triiodotironina.

Marcarea tiroxinei cu ^{131}I sau ^{125}I se efectuează în poziţiile 3, 5, 3′, 5′ sau uneori numai în 3′, 5′ avînd o activitate specifică pînă la 50 mCi/mg în soluţie injectabilă cînd radionuclidul este ^{131}I sau pînă la 15 mCi/mg cînd este marcată cu ^{125}I pentru utilizare *in vitro* sub formă de soluţie 50% propilen-glicol.

Ambii hormoni (T_4 şi T_3) se pot marca radioactiv prin metoda schimbului izotopic [41—43], folosind drept agent de marcare atît monoclorura de iod cît şi cloramina-T. Ultimul este folosit din ce în ce mai frecvent. De obicei, ca materie primă pentru marcare cu ^{131}I sau ^{125}I se folosesc compuşii neradioactivi tiroxina şi triiodotironina, obţinînd în final compuşii respectivi marcaţi radioactivi în poziţiile 3, 5, 3′, 5′ şi respectiv 3, 5, 3′. Uneori, pentru marcarea radioactivă a acestor hormoni, atunci cînd nu se dispune de compuşii ioduraţi T_3 şi T_4, se foloseşte metoda substituţiei şi astfel prin marcarea cu iod a tironinei se pot obţine mai mulţi derivaţi ioduraţi ai acesteia, ca mono- di-, tri- şi tetraiodotironina (tiroxina). Dificultatea acestei metode de marcare constă în faptul că se obţine un amestec de derivaţi ioduraţi ai tironinei, cu o pondere mai mare sau mai mică a celor tri- şi tetraioduraţi funcţie de o serie de factori (cantitatea de agent oxidant, pH-ul soluţiei, cantitatea de iodură radioactivă etc.) şi care, în final, necesită o separare radiochimică (cromatografie pe coloană cu schimbători de ioni, gel Sephadex, sau cromatografie pe hîrtie sau în strat subţire, urmată de o eluţie individuală a spoturilor compuşilor respectivi).

Purificarea acestor produse radiofarmaceutice de iodul liber (^{131}I$^-$ sau ^{125}I$^-$) se efectuează prin metoda cromatografică sau prin filtrare pe geluri de tip Sephadex [44, 45].

Tiroxina-^{131}I şi triiodotironina-^{131}I în soluţii apoase suferă o descompunere rapidă însoţită de formarea de derivaţi — oxidaţi (acizii 3, 5, 3′, 5′-tetraiodotirolactic şi 3, 5, 3′-triiodotirolactic) ai acestor hormoni şi de eliberarea de iod radioactiv sub formă de iodură, ca urmare a efectelor radiolitice ale radiaţiilor ionizante emise de radionuclidul cu care este marcat hormonul respectiv (autoradioliză). Studii detaliate în acest scop au fost întreprinse de mai mulţi autori [46—51] care au arătat că în afară

Scanned with OKEN Scanner

de aceşti produşi de autoradioliză, la doze mai mari de radiaţii (activităţi specifice înalte) cuprinse între 0,5—1,5 Mrad, se mai pot forma şi compuşi hidroxilaţi de tipul 3,4-dihidroxifenilalanină (DOPA), hidroxitironină, hidroxitiroxină etc., iar la doze şi mai mari are loc o scindare a tiroxinei sau triiodotironinei în două părţi: componenta fenolică şi o componentă ce conţine derivaţi ai acidului fenilpiruvic [46, 47, 50, 51]. Autoradioliza acestor doi hormoni tiroidieni este mai redusă dacă aceştia se află într-o soluţie alcoolică, de exemplu 50% propilen-glicol.

Aceste studii au demonstrat că, cantitatea de ^{131}I organic (legat în tiroxină) se reduce proporţional cu doza absorbită, astfel la o doză de 0,5 Mrad circa 50% din iodul radioactiv organic este pus în libertate sub formă de iodură (anorganic) [51], ceea ce impune condiţii stricte de stocare a produsului finit, imediat după marcare şi o limitare a valabilităţii la circa două săptămîni.

Determinarea purităţii radiochimice se efectuează prin metoda cromatografică pe hîrtie în strat subţire sau prin electroforeză [51—56].

Mono- şi diiodotirosina-^{131}I ori ^{125}I. Ambii compuşi se obţin prin iodurarea directă (substituţie) a *L*-tirosinei prin metoda cu cloramină-T în soluţie tampon de borat la pH = 8, în prezenţă de iodură de sodiu-^{131}I (^{125}I). Funcţie de concentraţia *L*-tirosinei şi de timpul de reacţie (iodurare) în final poate să rezulte diiodotirosină-^{131}I sau un amestec al acesteia cu monoiodotirosina-^{131}I. Astfel, la concentraţii foarte mici ale aminoacidului, 1 mg/ml, şi un timp de reacţie de 1—2 min, în general rezultă numai diiodotirosină [57], pe cînd la concentraţii de 20 de ori mai mari se obţine un amestec de mono- şi diiodotirosină în raportul de 6 : 1, iar la concentraţii şi mai mari, doar monoiodotirosină [58]. Alături de metode cu cloramină-T pentru marcarea cu iod radioactiv prin iodurare directă se mai folosesc metodele electrochimică şi aceea cu monoclorura de iod sau iodat [59—61, 63—66].

Purificarea de iodul liber sau de alţi produşi de reacţie se realizează prin metoda cromatografiei pe hîrtie sau în strat subţire [62], pe schimbători de ioni [59] sau filtrare pe coloane cu gel Sephadex [60].

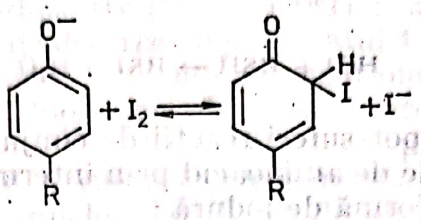
4.2.4.3. **Lipide-^{131}I.** Dintre compuşii radiofarmaceutici mai importanţi ai acestei clase utilizaţi în prezent în investigaţiile şi diagnosticul malabsorbţiei grăsimilor în intestine, provocată de tulburările gastrointestinale sau insuficienţă pancreatică, sînt: trioleina-^{131}I, acidul oleic-^{131}I şi unele uleiuri de plante şi arbori, ca uleiurile de măsline, de arahide şi altele. Marcarea acestor compuşi cu ^{131}I se efectuează prin reacţia de adiţie a iodului radioactiv la dubla legătură C = C folosind drept agent oxidant monoclorura de iod sau iodatul [67—73]. S-a observat că puritatea radiochimică a trioleinei marcate cu ^{131}I depinde în mare măsură de puritatea chimică a substanţei iniţiale. Astfel, unele impurităţi din trioleina nemarcată constau din mono-, di- şi trigliceride care suferă o iodurare preferenţială [74—77] şi reduc randamentul de marcare al trioleinei. Purificarea trioleinei de aceste impurităţi radioactive se realizează prin metoda cromatografiei pe hîrtie şi în strat subţire [74, 76—78], iar de iodul liber ^{131}I, prin extracţie din soluţie de eter cu o soluţie de iodură sau tiosulfat [79].

Conţinutul de iod liber în trioleina marcată cu ^{131}I de obicei este < 1% şi acesta se determină prin separarea iodului liber pe coloană cu schimbători de ioni [79] sau cromatografie pe hîrtie şi în strat subţire [80—83].

4.2.4.4. **Proteine plasmatice.** Dintre proteinele plasmatice mai importante pentru medicina nucleară, în prezent au devenit

Scanned with OKEN Scanner

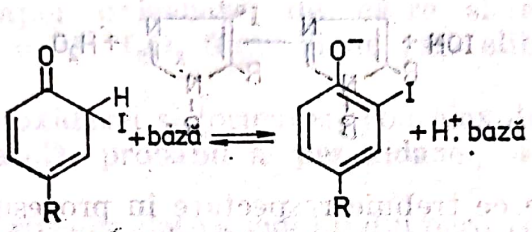
următoarele : serumalbumina, fibrinogenul şi gamaglobulinele. Marcarea cu ^{131}I sau ^{125}I a acestor proteine constă într-o iodurare a grupelor tirosinice din molecula proteinei respective, conform reacţiilor :



(4.22)

$R = -CH_2-CH(NH_2)-COOH$

care în prezenţa unei baze, pierde un proton în locul căruia se va lega iodul, de atomul de carbon din poziţia 3 al nucleului benzenic al grupei tirosinice :



(4.23)

După cum se poate vedea din cele de mai sus, reacţia (4.23) este în strînsă dependenţă de concentraţia OH^- şi I^- din sistem şi această reacţie controlează întregul proces de iodurare a proteinelor plasmatice. În ceea ce priveşte cinetica reacţiilor de iodurare a proteinelor plasmatice [84—89, 91] s-a observat că viteza mai mare de iodurare a grupelor tirosinice este la treapta monoiodotirosină pe cînd formarea de diiodotirosină are loc cu viteze mai mici. Astfel, iodurarea monoiodoacetiltirosinei în mediu bazic este de 30 de ori mai înceată decît cea a acetil-tirosinei [88], însă la valorile de pH cuprinse între 6,5 şi 7,5 atît tirosina cît şi monoiodotirosina practic se află nedisociate ; se consideră că vitezele de iodurare ale acestor compuşi, în aceste condiţii, sînt aproximativ egale.

Proprietăţile biologice ale proteinelor plasmatice marcate cu iod radioactiv depind în mare măsură de gradul de iodurare, de tehnicile şi de metodele de iodurare. În general, se acceptă, conform datelor experimentale că, iodurarea proteinelor plasmatice prin încorporarea în medie pînă la 1 atom de iod per moleculă de proteine nu duce la alterarea integrităţii biologice a acestora [90, 92—94, 97—105]. Cu toate acestea, unele proteine plasmatice, de exemplu fibrinogenul, îşi modifică comportamentul biologic chiar la gradul de iodurare de 0,5 atomi iod/moleculă, pe cînd albumina numai peste 2—3 atomi iod/moleculă [93, 105, 106].

În afară de gradul de iodurare excesiv al grupelor tirosinice asupra proprietăţilor (comportamentului) biologice ale proteinelor plasmatice, şi în general ale tuturor proteinelor, un rol important îl au reacţiile secundare de oxidare a grupelor —SH ale unor aminoacizi ce intră în compoziţia proteinelor, între care mai cu seamă menţionăm cisteina. Aceste reacţii secundare au loc concomitent cu procesul de iodurare şi sînt inevitabile, dar prin anumite măsuri de protecţie a proteinelor în timpul reacţiei de iodurare, acestea pot fi diminuate, funcţie de tipul proteinei în

Scanned with OKEN Scanner

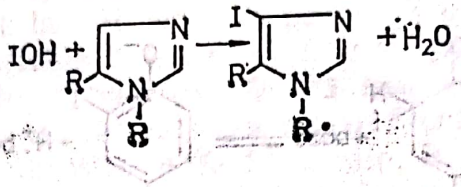
care se încorporează iodul radioactiv [104—108]. În general, se știe că oxidarea grupelor —SH poate să conducă la rezultate diferite în comportarea biologică a proteinelor, funcție de tipul proteinei. Astfel, acidul hipoiodos reacționează cu o serie de aminoacizi ce conțin grupe —SH, conform ecuației :

$$HOI + RSH \rightarrow RSI + H_2O \qquad (4.24)$$

Aceștia odată iodurați pot suferi reacții de conjugare ca urmare a legării între ele a două molecule de aminoacid prin intermediul atomilor de sulf și eliminarea iodului sub formă de iodură :

$$RSH + RSI \rightarrow RSSR + H^+ + I^- \qquad (4.25)$$

De asemenea, iodurarea histaminei sau oxidarea, în unele cazuri, a triptofanului (alte componente principale ale proteinelor plasmatice) duce la modificări ale integrității biologice a moleculei proteinei respective :



(4.26)

Condițiile principale ce trebuie respectate în procesul de marcare cu iod radioactiv a proteinelor, pentru evitarea alterării integrității lor biologice sînt următoarele [109]:

1) Proteina destinată marcării cu iod radioactiv trebuie să fie foarte pură, să nu conțină și alți compuși proteinici. În acest sens se recomandă o verificare a purității proteinei prin metode adecvate [110—112] ca electroforeza, ultracentrifugarea sau prin determinarea ratei de catabolizare fracționată;

2) Iodura de sodiu - ^{131}I sau ^{125}I trebuie să fie fără purtător, agenți reducători, stabilizanți sau substanțe bacteriostatice. Cantitatea de iod radioactiv introdusă în sistem trebuie să fie minimă, astfel ca să asigure un număr de impulsuri suficient pentru detectarea proteinei marcate. Un exces de iod radioactiv poate duce la o iodurare excesivă a grupărilor tirosinice și la oxidarea totală a grupărilor —SH, ceea ce modifică substanțial integritatea biologică a proteinei respective. Activitatea specifică prea mare a iodurii de sodiu radioactive de asemenea poate avea efecte negative, producînd autoradioliza proteinelor marcate. Pentru evitarea acestui fenomen se introduc în sisteme, după marcare, proteine ca serumalbumina pentru protejarea proteinei marcate. Gradul de iodurare se recomandă a se menține de 1 atom de iod per moleculă sau mai mic dacă situația permite;

3) Proteinele, în general, sînt foarte sensibile la temperatură : acizii și bazele sau solvenții organici influențează negativ asupra proprietăților biologice. În acest sens se impune ca procesul de marcare să se efectueze în medii ce au pH-ul cît mai apropiat de neutru;

4) Cantitatea de oxidant introdusă în sistem trebuie să fie minimă, dar suficientă ca oxidarea iodului să fie efectuată în timp scurt, astfel ca proteina să fie cît mai puțin afectată de prezența agentului oxidant;

5) Iodul radioactiv rămas după marcarea sub formă de iodură trebuie îndepărtat din sistem prin purificarea proteinei cu ajutorul metodelor adecvate : filtrarea pe coloane cu gel Sephadex, dializă, cromatografie,

Scanned with OKEN Scanner

coloane cu schimbători de ioni etc., iar cantitatea de iod liber rămas după purificare trebuie să fie cît mai mică posibil ;

6) Proteinele marcate se păstrează în condiţii sterile şi la temperaturi cuprinse între +4 şi —40°C, funcţie de perioada de stocare.

Marcarea cu iod radioactiv (^{131}I sau ^{125}I) a serumalbuminei se realizează prin una din tehnicile descrise în paragraful 4.2. Îndeosebi se foloseşte metoda electrochimică, care aşa cum se menţionează nu produce, nici o alterare a proprietăţilor biologice ale acestei proteine [107, 110, 113], pe cînd celelalte metode s-a demonstrat că pot provoca mai mult sau mai puţin modificări de structură şi în consecinţă alterarea integrităţii biologice prin oxidarea grupelor —SH sau de altă natură [93, 108, 110].

În ultimii ani, tot mai mult este utilizată ca metodă de iodurare a proteinelor, oxidarea enzimatică a iodurii [114, 114bis, 115] folosind sistemul : proteină + peroxidază + glucozo-oxidază + iodură de potasiu. Această metodă de oxidare a iodului promite a fi cea mai „blîndă" şi ca atare fără să producă modificări ale integrităţii biologice. Mecanismul reacţiei enzimatice constă din următoarele :

— generarea apei oxigenate, de către sistemul glucoză-glucooxidază, cu menţiunea că H_2O_2 formată nu este eliberată în mediul de reacţie,

— oxidarea peroxidazei şi formarea complexului peroxidază-H_2O_2,

— iodurarea labilă, probabil a peroxidazei, a punţilor —S—S— ale enzimei,

— transferul formei oxidate a iodului din peroxidază către substratul proteic din sistem. S-a observat că asupra mecanismului de oxidare enzimatic un rol inhibitor îl are excesul de iod aflat în sistem [115], de aceea concentraţia iodurii trebuie bine calculată şi menţinută în limitele de maximă eficienţă. Prin această metodă este posibilă o marcare a proteinelor *in vivo* [114 bis] diferenţiind astfel proteinele de suprafaţă din limfocitele normale şi cele neoplasmatice.

Marcarea fibrinogenului este mai dificilă decît a altor proteine, deoarece un grad de iodurare mai mare de 0,5 atomi de iod/moleculă produce modificări sensibile în comportamentul biologic al acestei proteine [106, 117], mai ales aceea de coagulare, care pentru un fibrinogen rămas intact după marcare trebuie să fie peste 90% (raportat la activitatea totală). S-a observat că fibrinogenul este foarte sensibil la condiţiile de lucru de a-şi modifica proprietăţile biologice chiar în timpul preparării şi purificării lui din plasmă, ceea ce necesită multă atenţie şi acurateţă. Stocarea fibrinogenului timp mai îndelungat, chiar la temperaturi joase, de asemenea duce la modificări ale comportamentului biologic [106, 106 bis]. În acest sens s-a impus necesitatea ca pentru marcarea lui cu iod radioactiv să fie elaborate metode rapide de preparare, marcare radioactivă şi purificare [118, 119]. Comparînd rezultatele obţinute [106 bis] la marcarea cu ^{131}I a fibrinogenului prin metodele : cloramină-T, electrochimică şi cu monoclorură de iod, s-a observat că metoda electrochimică oferă cele mai sigure condiţii în care activitatea biologică a fibrinogenului marcat se păstrează în măsura cea mai mare, 75—96%, pe cînd metoda cu cloramină-T 42—86%, iar cea cu ICl, 53—87%. Prepararea fibrinogenului sub formă de trusă se poate realiza efectuînd în prealabil liofilizarea lui şi apoi marcarea acestuia prin metoda cu ^{131}ICl [120]. Dintre utilizările mai importante ale fibrinogenului marcat cu iod radioactiv, în medicina nucleară se menţionează : studiul metabolismului fibrinogenului nativ, studiul proceselor de

Scanned with OKEN Scanner

hemocoagulare [121], diagnosticul unor tumori maligne [122, 123], studii ale circulației sanguine sau în maladii de ischemie tisulară [124].

Marcarea cu ^{82}Br a serumalbuminei și a fibrinogenului prin metoda electrochimică este descrisă în lucrarea [125] la pH = 6,6 — 7,0 și un curent de 1,5 mA, cu o durată de 3 ore. Rezultatele obținute și controlul purității radiochimice prin precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic, electroforeză și imunoelectroforeză pe geloză au indicat că atît serumalbumina cît și fibrinogenul marcate cu ^{82}Br (de activitate specifică 170—340 μCi/mg) la grupele tirosinice nu și-au modificat proprietățile biologice față de aceleași proteine native. Bromurarea proteinelor plasmatice permite obținerea de trasori dublu marcați, facilitînd astfel realizarea unor studii importante de metabolism și distribuție a proteinelor plasmatice.

Marcarea cu iod radioactiv a gamaglobulinelor se efectuează în aceeași manieră ca și fibrinogenul sau serumalbumina prin metoda cu ICl îmbunătățită [126] sau pe cale electrochimică [127]. Deoarece gamaglobulinele conțin trei componente (imunoglobuline), este foarte important ca proteina destinată marcării să fie pură. În acest sens se impune o purificare prin metode adecvate menționînd că rezultate bune se obțin prin separarea cromatografică a componentelor respective pe coloană cu Sephadex DEAE [128].

Printre proteinele plasmatice marcate cu iod radioactiv, un loc de frunte l-au ocupat agregatele de serumalbumină marcate cu ^{131}I, folosite ca agent pentru scintigrafia pulmonară, hepatică și splenică, a căror preparare este arătată în lucrările [129—131].

În prezent locul iodului ca radionuclid în aceste agregate (micro și macro) este tot mai mult ocupat de ^{99m}Tc și ^{113m}In, fapt ce determină ca descrierea acestor radiofarmaceutice să fie făcută în paragrafele 4.5. și 4.6.

4.2.4.5. **Hormoni proteici.** Pînă în prezent, dintre hormonii proteici (polipeptide) mai des utilizați în medicina nucleară pentru studii și determinări imunologice sînt următorii : insulina, hormonul de creștere sau somatotrofina (HGH), hormonul adrenocorticotropic (ACTH), hormonul paratiroid (PTH), hormonul tirostimulent sau tirotrofina (TSH), hormonul corionic gonadotropic sau gonadotrofina corionică (HCG), hormonul luteinizant (LH), hormonul placentar lactogen (HPL), hormonul foliculostimulent (FSH); glucagonul, gastrina și angiotensina I. Majoritatea acestor hormoni, pentru a putea fi utilizați în radioimunologie se marchează cu iod radioactiv, în mod frecvent cu ^{125}I și mai rar cu ^{131}I. Marcarea radioactivă cu ajutorul uneia din cele trei metode principale de marcare a proteinelor cu iod radioactiv : metoda cu ICl [65, 93], metoda electrolitică [113] și metoda cu cloramină-T [85, 134]. Mecanismul de marcare constă în oxidarea iodului din forma iodură I^- în ioni pozitivi I^+, care în prezența proteinelor în mediu aproape de neutru (pH = 6,5—7,5) intră în reacție de substituție a atomilor de hidrogen din grupele tirosinice ale hormonilor respectivi sau în reacție de adiție la dubla legătură. Menționăm că în ultimii ani pentru marcarea hormonilor polipeptidici este utilizată, în majoritatea cazurilor, numai metoda cu cloramină-T care a fost modificată pentru acest scop [134—136]. Astfel, reacția de iodurare a hormonului respectiv are loc în mediu de tampon fosfat, cu dozarea exactă a cantității de iod radioactiv ; se lucrează cu volume foarte mici, iar timpul de reacție este foarte scurt, de ordinul a 20—30 s. Pentru exemplificare, arătăm în mod succint procedeul de marcare : într-o eprubetă de centrifugă cu fund conic se pipetează 25—30 μl soluție tampon de fosfat 0,05 M ce are pH =7,5

Scanned with OKEN Scanner

după care se introduce iodura de sodiu ce conţine ^{131}I (10 μl, 1—3 mCi) sau ^{125}I (5 μl, 1 mCi). Apoi se introduce soluţia ce conţine hormonul respectiv (10—25 μl) conţinînd ~5 μg şi se agită prin scuturare. În paralel, se pregătesc două micropipete: prima conţine 10—15 μl de soluţie (50 μg) cloramină-T şi a doua 50 μl (125 μg) soluţie de metabisulfit de sodiu în soluţie 0,05 M fosfat de sodiu (pH = 7,5). Se introduce soluţia de cloramină-T în amestecul de reacţie sub formă de jet, pentru a se omogeniza rapid, apoi se socoteşte timpul scurs din momentul injectării, lăsînd exact 20 s, după care imediat se introduce soluţia de metabisulfit, din a doua micropipetă, pentru a stopa reacţia de iodurare. În final are loc operaţia de purificare de iodul liber rămas nelegat de proteina marcată radioactiv. Pentru a proteja hormonul respectiv de o degradare radiolitică sau variaţii de concentraţie chimică, temperatură, pH etc., soluţia în cauză se diluează cu o proteină nativă de altă structură, de obicei cu serumalbumină. Separarea are loc pe coloană cu gel Sephadex ce are un G adecvat, funcţie de greutatea moleculară a hormonului marcat radioactiv, sau prin electroforeză pe gel de amidon (agar-agar), celuloză sau răşini schimbătoare de ioni etc. O dată cu separarea iodului liber, pe coloană de gel Sephadex, are loc şi o purificare a proteinei marcate de proteina alterată în timpul marcării (polimerizare). Fracţiunea ce conţine hormonul marcat se mai diluează la nevoie cu altă proteină sau cu proteina endogenă şi se păstrează în loc ferit de lumină la temperatura +4°C pentru timp scurt (1—2 zile) sau la —20 — —40°C pentru timp îndelungat (~ 1 lună). Cazuri individuale de marcare a hormonilor proteici se descriu în lucrările [137 — 157 bis].

4.2.4.6. **Baze pirimidinice, ribozide şi desoxiriboziде.** Faptul că acizii nucleici conţin baze pirimidinice, timină, uracil şi citozină, marcarea lor cu izotopi radioactivi, permite studiul comportării acestora, a metabolismului lor, în organismul uman, îndeosebi a localizării în ţesuturile tumorale. Astfel s-a observat că 5-iodo-desoxiuridina marcată cu ^{131}I este încorporată în tumori de către acidul desoxiribonucleic [158, 159, 164], în locul timidinei, studiind cu ajutorul acestui trasor radioactiv traseul biologic al acizilor ribonucleici la nivel celular. Marcarea cu iod radioactiv a bazelor pirimidinice, ribozidelor şi desoxiribozidelor se realizează prin sinteză [160—163] introducînd la început în moleculă pirimidinică iodul radioactiv şi apoi prin schimb izotopic se introduce iodul radioactiv sau acesta se introduce direct ca de exemplu în 2′-desoxiuridină prin iodurarea acestui compus [160] pentru obţinerea compusului trasor 5-iodo-2′-desoxiuridină. Iodurarea timidinei şi a derivaţilor pirimidinici se mai poate efectua şi prin reacţii enzimatice (biosinteză) [165], dar acestea sînt mai dificil de condus pentru ca marcarea să fie specifică. O serie de compuşi marcaţi specific cu iod radioactiv se pot obţine prin metoda cu cloramină-T sau electrochimică [166, 167], de exemplu 5-ioduracil şi 5-ioduridină.

S-a observat că derivaţii iodaţi ai desoxiuridinei suferă în organism o degradare rapidă, în comparaţie cu alţi compuşi din clasa bazelor pirimidinice şi a ribozidelor. Acest fapt limitează oarecum utilizarea largă a acestor radiofarmaceutice în detectarea şi localizarea tumorilor tisulare.

4.2.4.7. **Hormoni steroizi.** Folosind reacţia de adiţie la legătura etilenică s-a marcat cu iod radioactiv compusul steroid difosfatul de dietilstilbestrol [168, 169, 170], în care agentul de iodurare a fost iodura de sodiu-^{131}I în soluţie de cloroform ce conţinea microcantităţi de ICl. Ulterior, pentru creşterea activităţii specifice s-a marcat cu iod neradio-

Scanned with OKEN Scanner

activ esterul difosfatului de dietilstilbestrol, prin metoda de mai sus, a cărui proporție în compusul respectiv a fost de circa 0,5%, după care introducerea iodului radioactiv s-a efectuat prin reacție de schimb izotopic la pH=5,5. Produsul marcat radioactiv a fost utilizat ca agent scintigrafic în diagnosticul prostatei, dar nu a primit o utilizare curentă.

Actualmente, prin legarea de molecula estradiolului a unui derivat de yperită și a unei grupe fosforice s-a obținut un nou produs (Estracyt-LEO) cu o activitate estrogenică crescută, solubil în soluții apoase, folosit curent ca agent citostatic în tratamentul adenocarcinomului de prostată [171—175]. Marcarea acestui citostatic cu ^{131}I s-a realizat prin metoda electrolitică [174, 175], iar la noi în țară prin metoda cu cloramină-T. A fost aplicat cu succes ca agent scintigrafic în diagnosticul adenocarcinomului de prostată, permițînd detectarea chiar a formelor incipiente ale acestuia [176,177]. Administrarea Estracytului ca citostatic se face în doze zilnice de 300—600 mg fiind bine suportat de om, avînd DL_{50} = 350 mg i.v. pentru șoareci. Pentru efectuarea unei scintigrafii a prostatei este suficientă o cantitate de 7—10 mg Estracyt-^{131}I în soluție tampon fosfat de pH = 6,5—7, cu o concentrație radioactivă de 0,7—1 mCi/ml administrînd i.v. 0,5—1 ml.

Localizarea Estracytului în organismul uman este specifică și se face numai la nivelul prostatei; fiind complexat de β-globuline este transportat de acestea în organismul-țintă formîndu-se un echilibru chimic între concentrația Estracytului fixat în prostată și cea din volumul sanguin.

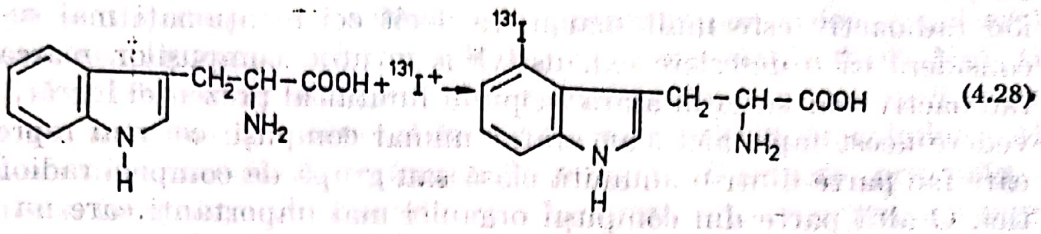
O importanță mai mare s-a acordat utilizării steroizilor marcați cu ^{125}I și ^{131}I și a derivaților acestora ca trasori în radioimunologie (RIA). Deoarece steroizii nu sînt compuși imunogeni „per se", pentru a-i utiliza în imunologie aceștia trebuie să fie conjugați la o moleculă proteică mare (serumalbumină, tiroglobulină etc.), stimulînd astfel funcția imunologică a acestora. Pentru a obține antiseruri capabile de a selecționa și totodată de a face o discriminare a compușilor steroizi în organism chiar care au o structură steroidică foarte apropiată, conjugarea trebuie să fie astfel făcută încît să nu se producă o distorsiune a structurii haptenei respective și totodată să se reducă la minimum marcarea sterică a grupelor specifice funcționale ale acesteia. Aceasta se poate realiza printr-o alegere judicioasă a poziției, în nucleul ciclopentan-fenantren, în care loc se conjugă molecula steroidului cu proteina. Astfel de compuși conjugați au fost obținuți conjugînd steroizii cu esterul tirosil-metil (TME) sau cu derivați ai acestuia. Dintre steroizii conjugați cu TME menționăm următorii: testosterona, aldosterona [178], estrona [179], progesterona, cortisolul [180] și alții [181, 182]. Marcarea cu ^{125}I a părții tirosil din molecula conjugată se efectuează prin metoda electrolitică [183] sau cu cloramină-T [184] fiind absolut necesare metode blînde de marcare cu iod radioactiv în scopul protejării proprietăților chimice și biologice ale moleculei conjugate.

4.2.4.8. **Aminoacizi.** Așa cum s-a menționat la marcarea cu iod a hormonilor steroizi, un mare rol în analiza radioimunologică (RIA) îl va avea marcarea cu iod radioactiv a grupărilor tirosil sau a derivaților acestora (tyrosyl residues) conjugate la o serie de compuși proteici ce nu conțin grupări tirosinice sau la haptenele care nu reacționează cu iodul. În acest fel se vor lărgi considerabil posibilitățile de utilizare în RIA a unor compuși proteici sau neproteici (antigene) care altfel nu puteau fi marcați cu iod radioactiv, și care au mare afinitate față de antiseruri, de exemplu conjugarea grupei desaminotirosinil cu grupa arginil N-terminală a bradykininei [185] sau conjugarea cu tetrapeptida C-terminală a gastrinei [186].

Scanned with OKEN Scanner

Înafară de triiodotironină, tiroxină, tirosină şi derivaţii acestora, a căror marcare cu iod radioactiv s-a arătat în paragraful 4.2.4.2, pînă în prezent numai cîţiva aminoacizi marcaţi cu iod se mai utilizează ca atare în medicina nucleară, îndeosebi acei care conţin în structura lor nuclee benzenice.

Între aceştia menţionăm DL-fenilalanina, triptofanul. Astfel, DL-triptofanul reacţionează cu iodul conform ecuaţiei :



(4.28)

În mod similar are loc şi iodurarea DL-fenilalaninei.

Oxidarea iodului se poate efectua atît cu cloramină-T cît şi electrolitic. Marcarea cu tritiu a triptofanului [187] este facilitată de bromurare sau iodurare prealabilă prin metode adecvate [188—190].

4.2.4.9. **Anticorpi.** Anticorpii fiind substanţe cu caracter proteic, prezenţi în fracţiunea globulinică a serului, marcarea lor cu izotopi radioactivi ai iodului, deschide noi posibilităţi de diagnosticare *in vitro* precum şi de utilizare a acestora în scopuri terapeutice. Metodele de marcare cu iod radioactiv a anticorpilor sînt identice cu cele utilizate şi descrise pentru marcarea proteinelor (§ 4.2.4.4. — 4.2.4.8) [191, 192]. O serie de anticorpi marcaţi cu iod radioactiv au fost utilizaţi în studii şi diagnosticul unor tumori, în localizarea acestora. Diferite aspecte implicate în aceste studii sînt descrise în lucrările [193—195].

Se ştie că din întreaga cantitate a anticorpilor din fracţiunea globulinică a serului, circa 0,2% reacţionează nespecific cu diferite antigene, pe cînd reacţii specifice cu antigenele, produc numai o parte mică, circa 0,02% din totalul anticorpilor aflaţi în fracţiunea globulinică [109, 193].

Avînd la bază specificitatea de reacţie a unor anticorpi marcaţi radioactiv s-au studiat şi elaborat metode de determinare (dozare) a unor antigene, folosind metoda radioimunologică descrisă iniţial în lucrarea [196]. Un astfel de exemplu îl constituie dozarea radioimunologică a α-fetoproteinelor (α-FP) umane [197, 198], în care agentul iodurat radioactiv este anticorpul α-FP sau chiar antigena [199_a, 199_b]. Aplicînd metoda cu cloramină-T de marcare cu iod radioactiv a anti-αFP sau chiar a α-FP, se obţin anticorpi marcaţi cu ^{125}I de activitate specifică 15—40 μCi/μg care la astfel de activităţi conţin circa 0,5 atomi I/ml şi pot fi stocaţi la +4°C timp de peste 5 săptămîni.

Deşi α-FP nu este o substanţă antigenică în organismul gazdă, ea poate produce anticorpi la alte specii de animale. Considerînd că marcarea directă a anticorpului sau a antigenei cu iod radioactiv poate duce la o alterare a integrităţii lor biologice, ceea ce ar afecta direct reacţia imunologică, autorii [200] au elaborat o nouă metodă de dozare a α-FP în care aceşti factori au fost eliminaţi. În această metodă, spre deosebire de cea clasică menţionată mai sus [196—199], agentul marcat cu iod radioactiv este anti-IgG (capră, anti-iepure). Concentraţia antigenei în proba de analizat este determinată prin fracţiunea de anticorp liber, la echilibru şi

care la rîndul ei este determinată prin titrare cu anti-IgG marcată cu ^{125}I, după ce această fracţiune de anticorp liber a fost în prealabil adsorbită pe un suport antigen în faza solidă. În prezent această metodă se aplică la noi în ţară ca metodă curentă de determinare a α-FP, fiind accesibilă şi livrată sub formă de trusă [201].

4.2.4.10. **Alţi compuşi radiofarmaceutici marcaţi cu iod radioactiv.** Deoarece numărul compuşilor marcaţi cu iod radioactiv este mult mai mare decît cei menţionaţi mai sus, autorii consideră că o descriere exhaustivă a tuturor compuşilor marcaţi cu iod radioactiv s-ar situa în afara scopului limitat al prezentei lucrări. Avînd în vedere acest fapt, aici s-au arătat numai compuşii cei mai reprezentativi care fac parte dintr-o anumită clasă sau grupă de compuşi radiofarmaceutici. O altă parte din compuşii organici mai importanţi care nu fac parte dintr-o anumită clasă sau grupă discutată anterior dar care nu au primit încă o largă utilizare în medicina nucleară sînt menţionaţi în tabela 4.1

TABELA 4.1

Compuşi radiofarmaceutici marcaţi cu ^{131}I

Nr.	Denumirea compusului radiofarmaceutic	Bibliografie
1	2,4,5,7-Tetraiodo-3′,4′,5′,6′-tetraclorofluoresceină (Roz Bengal)	[47, 50, 51, 67, 202—208]
2	Acid 3 metilamidocarboxi-5-acetilamino-2,4,6-triiodobenzoic (iodthalamat de sodiu) (Conray)	[209, 210]
3	4-Iodoantipirină (1-fenil-2,3-dimetil-4-iodpirazolonă)	[211, 212, 230]
4	Polivinil-pirolidonă	[213, 214]
5	2-Metoxi-6-cloro-9/1-metil-4-dietil-amino-butilamină/ acridină sau atabrină	[215, 216]
6	Acid 3,5-diiodo-4-piridonă-1-acetic sau Diiodonă	[217, 218]
7	Acid adipoil-bis/N-3-amino-2,4,6-triiodobenzoic) sau Iodipamidă sau Biligrafin	[218, 219]
8	3-Amino-7-dimetilamino-2-metilfenazotionă sau albastru de toluidină	[220]
9	Clorura 3,7-dimetilamino-fenazotionă sau albastru de metilen	[221]
10	Difluorescenilmercur + hidroximercuri-fluoresceină (Mercurascan)	[222]
11	Roşu de Congo	[223]
12	Inulină	[224, 225]
13	Aglutinină	[226]
14	Oxitocină	[227]
15	Erythropoietină	[228]
16	Iodbenzen	[229]
17	Sulfobromophtaleină	[231, 232]
18	Difenilhidantoină	[233]
19	Diclorodifenildicloretan (DDD^{131}I)	[234]
20	α-Bungarotoxină	[235]
21	N-3-Iodo(^{131}I-benzensulfonil-n-propiluree)	[236]
22	Gram negative, bacterii	[237]
23	Penicilină (derivaţi)	[238]
24	7-Iodo-6-desoxitetraciclină	[239]
25	N-(4-Iodopirazol-metil) tetraciclină	[240]
26	Tubocurarină (alcaloid)	[241]
27	Digoxigenine, digitoxigenine	[242, 243]

Scanned with OKEN Scanner

4.3. COMPUȘI ORGANICI MARCAȚI CU ^{35}S și ^{75}Se

4.3.1. COMPUȘI MARCAȚI CU ^{35}S

Compuși organici marcați cu ^{35}S pînă în prezent au primit o utilizare mai cu seamă în studii biologice *in vitro* iar *in vivo* numai pe animale. Acest fapt se datorește în exclusivitate proprietăților fizice (nucleare) ale ^{35}S care este un radionuclid emițător β cu o energie de 0,167 MeV și $T_{1/2} = 87$ zile. Din cauza energiei mici, spre deosebire de cea a ^{75}Se cu care se poate asemăna din punctul de vedere al proprietăților chimice și al comportamentului biologic în organism, ^{35}S nu poate fi detectat prin măsurători directe (scanning) cînd acesta este localizat într-un organ oarecare sub forma unui radiofarmaceutic ci numai prin măsurători indirecte, prin intermediul fluidelor colectate după metabolizarea compusului respectiv sau cu ajutorul histoautoradiografiei țesutului în care a fost localizat ^{35}S. Producerea la ciclotron la scară largă a radionuclidului ^{38}S care este un emițător β, γ cu energia γ de 1,88 MeV și $T_{1/2} = 2{,}87$ h, va putea da sulfului radioactiv noi și largi utilizări în medicina nucleară [244a].

Marcarea compușilor organici cu ^{35}S se efectuează prin intermediul a trei metode principale :

a) sinteză chimică (radiochimică),

b) schimb izotopic,

c) biosinteză.

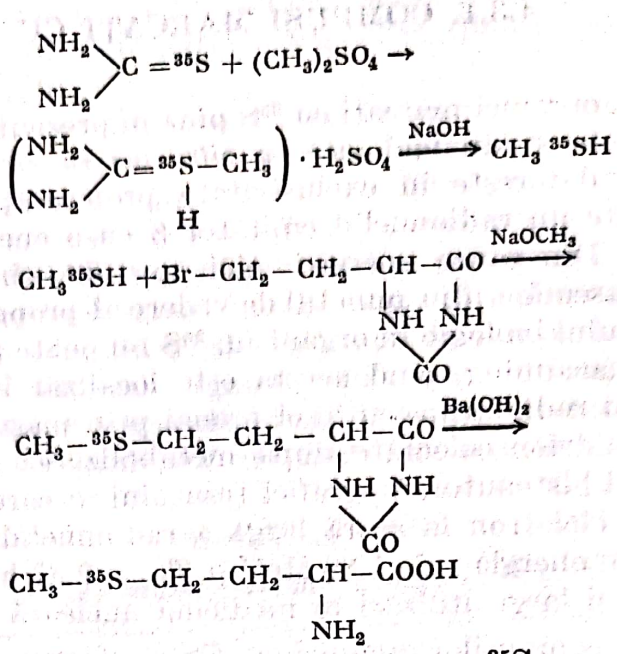
Alegerea uneia sau alteia dintre metodele citate se face în funcție de natura și structura chimică a compusului respectiv destinat marcării cu ^{35}S.

Marcarea cu ^{35}S prin sinteză, a unor compuși organici ca : tiamina (vitamina B_1), metionina, sulfamat, ceruleină și alții este descrisă în lucrările [245, 246, 248, 249, 251].

În majoritatea cazurilor, compusul intermediar radioactiv ce conține ^{35}S, care servește drept materie primă pentru sinteza respectivă, este tioureea-^{35}S, $Na_2{}^{35}SO_4$ (sau sulfitul), sau $Na_2{}^{35}S$ și mai rar se folosește $^{35}SO_2$. Astfel, pentru sinteza tiaminei [251] compusul intermediar radioactiv este $CS^{35}S$. În prima treaptă a sintezei are loc saponificarea 2-metil-4-amino-5-acetaminometilpiridinei, după care compusul rezultat este pus în contact cu $CS^{35}S$. La terminarea reacției dintre sulfura de carbon radioactivă se introduce 3-clor-3-acetopropanol-1 avînd loc reacția de formare a ditiocarbaminatului care se separă din mediul de reacție. Introducerea de HCl în sistem duce la închiderea inelului tiazol. Oxidarea sulfurii radioactive de la treapta tio la sulfat se face cu perhidrol, după care tiamina este precipitată din sistem cu ajutorul sulfocianurii. Pentru purificarea tiaminei se folosește metoda schimbului ionic și recristalizarea repetată. În final se obține un produs radiochimic pur ($> 98\%$) cu o activitate biologică mai mare de 90%.

Scanned with OKEN Scanner

În sinteza metioninei-^{35}S, compusul intermediar radioactiv este tioureea-^{35}S. Schematic, această sinteză este ilustrată prin următoarele reacţii [249]:



(4.29)

Sinteza unor compuşi organici marcaţi cu ^{35}S ca: -etan-sulfonil-clorura, diizoamilsulfosuccinatul de sodiu, anhidrida *o*-sulfobenzoică, taurina, zaharina etc., plecînd de la $^{35}SO_2$ este arătată în lucrarea [244 b] în care se folosesc o serie de intermediari radioactivi între care un loc important ocupă: $NaH^{35}SO_3$, $H^{35}SO_3$, $Na_2{}^{35}SO_3$, $^{35}SO_2Cl_2$ sau $^{35}SOCl_2$.

Schimbul izotopic atît pe cale uscată cît şi în soluţii oferă posibilităţi largi de marcare cu ^{35}S a compuşilor organici. Astfel pe cale uscată în mediu de sulf elementar topit ce conţine ^{35}S în proporţie de 0,3 : 1 sau dizolvat în CS_2 s-au marcat o serie de compuşi organici [250] între care se menţionează: tiosemicarbazona-*p*-acetilaminobenzaldehida (tebizona), tioureea, feniltioureea, tioxantina, 2-uracil, 6-metil-2-tiouracil, tioacetamida, sulfanilamida etc., sau unii compuşi anorganici. Asupra mecanismului şi randamentului de marcare prin această metodă o influenţă deosebită o au temperatura, factorul de omogenitate a sistemului şi timpul de reacţie, ultimul fiind în directă dependenţă de temperatură, variind de la compus la compus între 3 şi 9 ore, la $T = 200 - 280°C$.

În soluţii de piridină la temperatura punctului de fierbere a acestora sau alţi solvenţi adecvaţi folosind metoda schimbului izotopic [262, 264—267] s-au marcat cu ^{35}S o gamă largă de compuşi organici între care tiopentalul, tioxantina, tioguanina, 2-tiouracilul, 6-mercaptopurina, prometrina şi alţii.

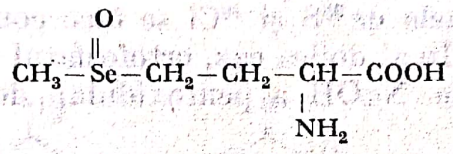
Marcarea unor compuşi organici cu ^{35}S prin biosinteză actualmente se face îndeosebi pentru aceia care posedă proprietăţi optice sau poziţii specifice ce nu pot fi păstrate nealterate prin marcarea lor prin alte metode. Astfel, compuşi levo-activi, ca unii aminoacizi sau alţi compuşi bioactivi, ca antibioticele ce conţin atomi de sulf se marchează cu ^{35}S (sau ^{75}Se) prin metoda biosintezei folosind culturi de microorganisme, enzime, ciuperci, alge sau substanţe *in vivo* (animale necastrate) sau *in vitro* utilizînd drept medii organe şi organele de animale [247, 268, 269]. Folosind culturi de *Escherichia Coli* şi un mediu de sulfat de sodiu-^{35}S s-au obţinut randamente mărite în marcarea cu ^{35}S a L-metioninei [270].

Scanned with OKEN Scanner

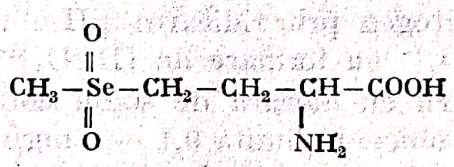
4.3.2. COMPUȘI MARCAȚI CU ^{75}Se

Compuși organici marcați cu ^{75}Se, la fel ca și analogii lor ce conțin sulf, se caracterizează prin aceea că formează complecși ce posedă o energie mare a legăturilor chimice. Similaritatea în comportamentul biologic al acestor compuși se bazează pe trăsăturile comune ale atomilor de sulf și seleniu, avînd electronegativități (potențiale de ionizare) și raze ionice apropiate.

Dintre compușii radiofarmaceutici marcați cu ^{75}Se mai importanți se detașează L-selenometionina utilizat ca agent scintigrafic în diagnosticul pancreasului. Marcarea cu ^{75}Se a acestui compus, pînă în prezent, se face prin biosinteză [252, 260]. Din datele publicate [253, 257, 261], se poate conclude că ^{75}Se-selenometionina este stabilă din punct de vedere radiolitic în soluții deaerate și în faza solidă avînd o mai mare capacitate de captare a radicalilor liberi produși în procesul de radioliză decît ^{35}S-metionina. În cursul determinărilor cromatografice ale purității radiochimice a acestui compus radiofarmaceutic este necesar lucrul în atmosferă inertă de azot și soluții deaerate pentru evitarea formării de artifacte datorită oxidării seleniului cu formare de selenometionină-selenoxid și selenometionină-selenonă [261]:



(4.30)



O serie de compuși metilați ai seleniului, ca dimetilseleniura-^{75}Se și trimetilselenona — ^{75}Se [271], au fost sintetizați pe cale chimică și recomandați pentru teste ale funcției renale.

Recent, L-selenometionina-^{75}Se a fost sintetizată prin metoda radiochimică [272] folosind intermediari metilați ai seleniului. Astfel, această metodă oferă posibilități mărite de producere a acestui radiofarmaceutic, față de metoda biosintezei. Purificarea produsului final (obținut cu randament mic 20 —30%) din mediul de biosinteză se realizează prin separare pe coloane cu schimbători de ioni și filtrare pe geluri, pe cînd în cazul sintezei radiochimice (randament $\approx$ 60 —65%) se efectuează prin precipitare și recristalizare.

Despre noi posibilități de introducere a Se în compușii radiofarmaceutici se menționează în lucrarea [263].

4.4. COMPUȘI MARCAȚI CU ^{32}P

Compușii marcați cu ^{32}P mai importanți folosiți în studii biologice și medicale sînt: fosfatul de sodiu, fosfatul cromic, compuși de fosfor cu fluorul, ca diizopropilfluorofosfatul, și o serie de nucleotide ca: adenozina,

Scanned with OKEN Scanner

citidina, guanozina, uridina, timidina etc., sub formă de compuși fosforilați ai acestor baze purinice și pirimidinice. Astfel, compușii mai simpli, încă din primii ani ai medicinii nucleare au fost folosiți în diagnosticul unor leziuni inflamatorii, tumori sau determinări ale debitului sanguin cerebral sau a celui vascular periferic. Datorită faptului că fosfatul ia parte la metabolismul acizilor nucleici, acumulîndu-se în locurile cu o intensitate mare de proliferare a celulelor (în special în tumori), în ultimii ani o utilizare tot mai largă în studiile de metabolism al acizilor nucleici, au primit-o nucleotidele marcate cu ^{32}P.

4.4.1. FOSFATUL DE SODIU-^{32}P

Ortofosfatul de sodiu-^{32}P ca soluție injectabilă se prepară din fosfor radioactiv fără purtător, obținut prin reacția nucleară ^{32}S $(n, p)^{32}P$, pe cînd cel utilizat pe cale orală se obține cu purtător folosind reacția nucleară ^{31}P $(n, \gamma)^{32}P$. În primul caz tehnologia de separare a ^{32}P de sulf constă, în principal, în extracția fosforului cu tricloretilenă după care urmează oxidarea acesteia cu H_2O_2 și trecerea în fosfat [273]. Purificarea produsului final de urmele de ^{35}S și ^{36}Cl se face concomitent cu extracția ^{32}P cu tricloretilenă. În al doilea caz, ortofosfatul se obține direct prin dizolvarea în soluție de NaOH a pentoxidului de fosfor, iradiat cu neutroni.

Izotonizarea soluțiilor de ortofosfat de sodiu-^{32}P se poate face atît cu NaCl cît și în mod autogen prin ridicarea pH-ului la 6—8 producînd disocierea ionilor $[H_2PO_4]^-$ cu formare de $[HPO_4]^{2-}$.

În cazul izotonizării cu clorură de sodiu concentrația chimică a fosforului se situează de obicei în limita 0,1 — 1 mg/ml, pe cînd în ultimul caz aceasta se menține mai ridicată, în jur de 4 mg/ml.

4.4.2. FOSFATUL CROMIC-^{32}P

Fosfatul cromic-^{32}P de obicei se folosește ca soluție injectabilă pentru determinarea debitului sanguin hepatic sau în terapie, sub formă coloidală. Această soluție coloidală se poate prepara cel puțin prin două metode principale: dispersia precipitatului de fosfat cromic-^{32}P într-o sferă cu bile sau agitator [274], ori prin precipitarea fosfatului cromic în prezența unui agent coloidal ce are rol protector [275—277]. Dimensiunile particulelor coloidale, în prima metodă, depind de durata de agitare în moara cu bile (10 minute agitare produce particule cu diam. $\sim 1\ \mu$, iar în a doua metodă de condițiile de precipitare și de concentrația soluției coloidale.

Preparatele de fosfat cromic-^{32}P se livrează cu activități specifice destul de mari, pînă la 10 mCi/mg $CrPO_4$ și cu o puritate radiochimică și radionuclidică adecvată.

Scanned with OKEN Scanner

4.4.3. NUCLEOTIDE MARCATE CU ^{32}P

În ultimii ani o largă utilizare în biologie, biochimie şi studiile medicale au primit-o nucleotidele marcate cu ^{32}P. Dintre acestea mai importante sînt următoarele :

Adenozină-5′-monofosfat [α-^{32}P]
Adenozină-5-trifosfat [α-^{32}P] şi [γ-^{32}P]
Citidină-5′-trifosfat [α-^{32}P] şi [γ-^{32}P]
Guanozină-5′-trifosfat [α-^{32}P]
Desoxiguanozină-5′-trifosfat [α-^{32}P]
Uridină-5′-trifosfat [α-^{32}P] şi [γ-^{32}P]
Timidină-5′-trifosfat [α-^{32}P]
Adenozină-3′,5′-ciclofosfat precum şi mono-, di- şi ciclo-fosfaţii acestor nucleozide (fig. 4.1).

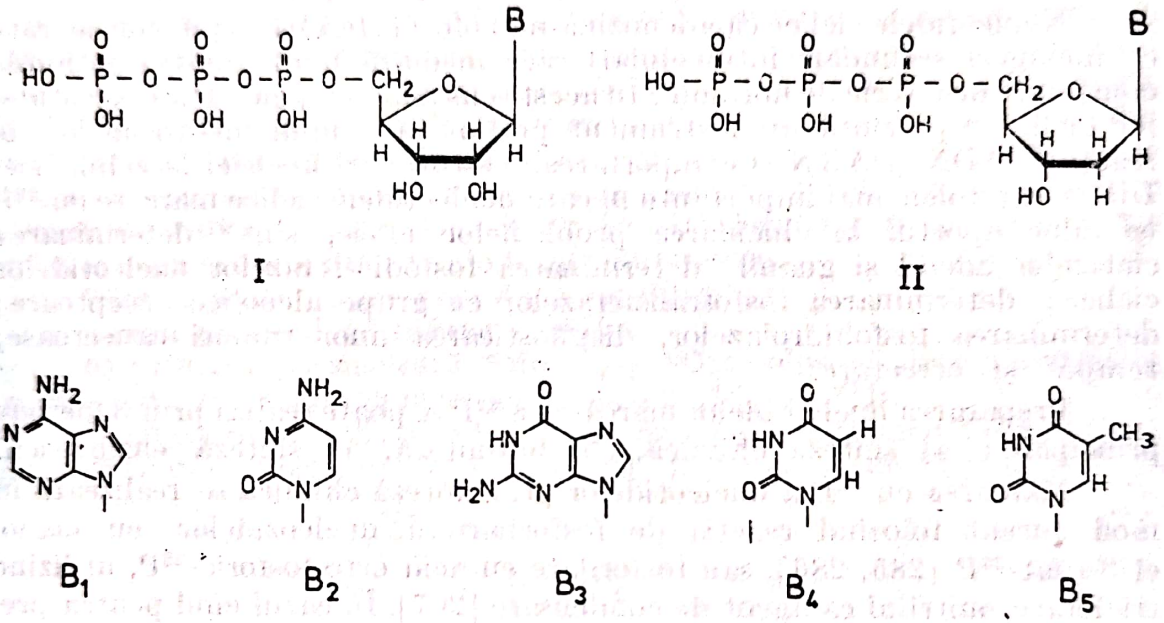


Fig. 4.1. — Formulele ribo- (I) şi desoxiribonucleotidelor de tipul acidului adenozin-trifosforic (II—B_1), guanozintrifosforic (II—B_3), etc.

Utilizările principale ale acestor compuşi în domeniile menţionate mai sus sînt cele legate de determinarea structurii şi metabolismului acizilor nucleici. În acest sens se folosesc mai multe metode, între care mai importante sînt : fracţionarea succesivă a acizilor nucleici prin tehnica amprentelor [278—281] şi analiza grupelor vicinale a celor mai apropiate [282, 283].

Metoda fracţionării succesive constă în degradarea enzimatică a acizilor nucleici marcaţi cu ^{32}P şi fracţionarea oligonucleotidelor rezultate, folosind tehnica electroforezei bidimensionale. Cromatogramele se supun, în continuare, autoradiografiei cu ajutorul căreia se detectează spoturile (amprentele) individuale ale oligonucleotidelor separate electroforetic care aduc astfel informaţii asupra compoziţiei şi structurii acizilor nucleici. Pentru acest scop este suficientă o cantitate de 0,1 mg de acid nucleic marcat cu ^{32}P pentru a determina şi caracteriza în detaliu moleculele de acid maleic [284].

În metoda analizei de bază a grupelor vicinale a celor mai apropiate, nucleotidele marcate cu ^{32}P în poziţia 5′ sînt încorporate într-un acid nucleic, care la rîndul lui este apoi degradat rezultînd o nucleotidă marcată în

poziția 3′ și ^{32}P. Astfel ^{32}P este transferat de la o nucleotidă la o altă nucleotidă vecină, dar în poziție diferită [284].

Cu ajutorul acestor metode se poate determina atît inițierea formării lanțurilor de acizi nucleici cît și lungimea acestora. Astfel, în sinteza ADN dependentă de sinteza ARN și a polimerazei-ARN indusă, nucleotida inițială încorporată într-un fosfodiester de legătură pe tot timpul lungirii succesive a lanțului reține grupele β și γ de fosfat. În acest fel încorporarea unui nucleozid-trifosfat-γ-^{32}P într-un acid ARN solubil reprezintă un indiciu de inițiere a lanțului de ARN. În același timp încorporarea nucleotidei-α-^{32}P reprezintă și o măsură a sintezei totale a lanțului ARN, iar raportul dintre cantitatea de ARN sintetizat și inițierea totală arată lungimea medie a lanțului de ARN produs prin reacția de polimerază.

Nucleotidele ciclice ca adenozină-monofosfat (cAMP) sînt considerate ca mesageri secundari intracelulari care mediază multe dintre acțiunile controlate de o serie de hormoni. În acest sens marcarea cu ^{32}P a nucleotidelor ciclice reprezintă un instrument prețios în studiul mecanismelor de reacție a ADN și ARN și comportarea acestor acizi nucleici în celula vie. Dintre capitolele mai importante în care nucleotidele ciclice marcate cu ^{32}P își aduc aportul la elucidarea problemelor cheie, sînt: determinarea ciclazelor adenil și guanil; determinarea fosfodiesterazelor nucleotidelor ciclice; determinarea fosfotransferazelor cu grupe alcoolice acceptoare; determinarea fosfohidrolazelor, diagnosticarea unor tumori canceroase, terapie și cercetare.

Prepararea nucleotidelor marcate cu ^{32}P se poate realiza prin 3 metode principale: a) sinteză chimică, b) biosinteză, c) sinteză enzimatică.

Marcarea cu ^{32}P a nucleotidelor prin sinteză chimică se realizează în mod curent folosind reacția de fosforilare a nucleozidelor cu cianoetilfosfat-^{32}P [285, 286], sau fosforilare cu acid orto-fosforic-^{32}P, utilizînd tricloracetonitrilul ca agent de condensare [267]. În cazul cînd pentru prepararea nucleotidelor-^{32}P se folosesc ribonucleozide și desoxiribonucleozide în formă neprotejată, atunci toate grupele OH sînt susceptibile unei reacții de fosforilare.

În marcarea nucleotidelor cu ^{32}P prin metoda biosintezei se folosesc culturi *E. Coli* ce conțin ortofosfat-^{32}P [288, 289].

Metoda de sinteză enzimatică a nucleotidelor marcate cu ^{32}P, în ultimii ani, a primit o largă răspîndire pentru obținerea curentă a acestor produse radioactive. Astfel nucleotidele-5′-trifosfat marcate în poziția 2 cu ^{32}P se pot prepara pe această cale, folosind schimbul enzimatic al ortofosfatului-^{32}P cu grupele terminale de fosfat din nucleotidele 5′-trifosfat [290, 291], pe cînd ribonucleotidele monofosfat-^{32}P se prepară prin cuplarea unor nucleozide protejate cu ortofosfatul-^{32}P folosind tricloracetonitrilul ca agent de condensare [287, 292]. Desoxiribonucleotidele monofosfat-^{32}P se prepară așa cum s-a menționat mai sus dar în acest caz se folosesc nucleotide neprotejate. În ceea ce privește prepararea nucleotidelor-trifosfat-^{32}P acestea se obțin prin fosforilarea enzimatică succesivă, pornind de la nucleotide monofosfat-^{32}P. Fosforilarea enzimatică față de cea chimică este mai selectivă dat fiind că în cazul fosforilării desoxinucleozidelor, pe această cale, se evită formarea de 3′-trifosfați.

Scanned with OKEN Scanner

4.5. COMPUȘI MARCAȚI CU ^{99m}Tc

4.5.1. PERTECHNETAT DE SODIU (^{99m}Tc)

Techneţiul este un element radioactiv artificial, cu numărul atomic 43 şi are descoperiţi pînă în prezent 19 izotopi (radionuclizi) cu masele atomice cuprinse între 92 şi 110. Dintre aceştia o mare parte, circa 7 izotopi provin din dezintegrarea radioactivă a unor izotopi ai molibdenului, o parte mai mică din dezintegrarea unor izotopi ai ruteniului, iar alţii sînt obţinuţi prin diferite reacţii nucleare cu particule încărcate.

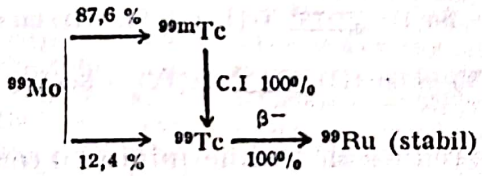
Comportamentul biologic al techneţiului fiind similar cu cel al halogenilor, în special cu cel al iodului, a determinat ca acest element să fie utilizat ca trasor în medicina nucleară. Dintre toţi radioizotopii techneţiului radionuclidul cu masa atomică ^{99m}Tc prezintă pentru medicina nucleară un interes deosebit datorită proprietăţilor sale fizice avantajoase : $T_{1/2} = 6{,}1$ h şi o singură radiaţie gamma cu $E = 140$ keV, fără radiaţie β concurentă. Radiaţia gamma de 140 keV ce rezultă din dezintegrarea radionuclidului ^{99m}Tc conform schemei de mai jos, poate fi uşor colimată, obţinîndu-se viteze de numărare (înregistrare) a compuşilor suficient de mari şi cu o eficacitate ridicată chiar dacă ^{99m}Tc se află localizat în organe critice diferite şi cu grosimi diferite ale ţesutului biologic.

^{99}Mo se poate obţine prin două căi diferite :

a) din procesul de fisiune a ^{235}U ;

b) prin reacţia nucleară ^{98}Mo (n, γ) ^{99}Mo folosind ţinte îmbogăţite $\approx 80-90\%$ în 98 Mo sau neîmbogăţite cu 23,7 % — ^{98}Mo.

Dezintegrarea radioactivă a ^{99}Mo conduce la formarea radionuclizilor : ^{99m}Tc în proporţie de 87, 6 % şi a ^{99}Tc în proporţie de 12,4 %.



S-ar părea că acumularea de ^{99}Tc în organul critic prezintă un pericol pentru sănătatea pacientului mai ales că $T_{1/2}$ a ^{99}Tc este de $2{,}1 \cdot 10^5$ ani, avînd o energie β de 0,3 MeV, dar acesta este înlăturat datorită următoarelor proprietăţi ale techneţiului :

a) timpul biologic de înjumătăţire a ^{99}Tc este la fel ca cel al ^{99m}Tc de circa 75 ore, iar eliminarea totală are loc în circa 14 zile ;

b) cantitatea de ^{99}Tc rezultată în urma administrării unei doze de 10 mCi de ^{99m}Tc este de $3{,}3 \cdot 10^{-6}$ μg [293, 294] ;

c) eliminarea ^{99}Tc din organism are loc în primele 24 ore în proporţie de pînă la 88 % (în principal pe cale urinară, cînd este administrat i.v.).

Doza absorbită, livrată întregului organism la administrarea a 1 mCi ^{99m}Tc este de circa 10 — 14 mrem, iar pentru un organ critic de exemplu : tiroida — 100 mrem sau tubul digestiv 100—290 mrem [295, 296]. Deoarece valoarea $T_{1/2}$ pentru ^{99m}Tc este mai mică decît cea pentru $T_{1/2}$ biologic, desigur şi doza absorbită livrată organului critic va descreşte fiind limitată în timp la maximum 61 ore, timp după care întreaga activitate a ^{99m}Tc introdusă în organism ajunge aproximativ la valoarea zero.

În literatura de specialitate chimia techneţiului este descrisă în multe lucrări, dintre care principalele [297—300] arată că acest radio-

Scanned with OKEN Scanner

element comportă proprietăţi chimice similare cu ale reniului şi ceva mai îndepărtate cu cele ale manganului. Astfel Tc are stările de valenţă + 7 (+6), (+5), +4, (+3) la fel ca reniul cu deosebirea că starea (+3) a techneţiului este instabilă în soluţie. Celelalte stări scrise în paranteze, pentru ambele radioelemente sînt instabile în soluţii şi se caracterizează prin reacţie de disproporţionare cu formare de compuşi în stările de valenţe stabile +7 şi +4.

^{99m}Tc se obţine în starea de valenţă +7 sub formă de pertechnetat de sodiu în concentraţii $10^{-9} - 10^{-11}$M prin separarea lui de ^{99}Mo fie prin eluţie cu o soluţie 0,9% NaCl de pe o coloană de Al_2O_3 (generator) pe care este adsorbit ^{99}Mo sub formă de molibdat de amoniu, fie prin extracţie cu metiletilcetonă dintr-o soluţie de 5—6 N NaOH urmată de îndepărtarea solventului organic, purificare şi dizolvarea ^{99m}Tc în soluţie 0,9% NaCl sterilă.

Comparînd cele trei metode de obţinere a ^{99}Mo ce conduc, în final, la obţinerea ^{99m}Tc sub formă de pertechnetat din generatorii pe coloană sau cu extracţie se pot face unele remarci menţionate în tabela 4.2.

Încorporarea ^{99m}Tc în compuşi organici, pentru a deveni radiofarmaceutice, implică reducerea techneţiului de la valenţa Tc(VII) la valenţele inferioare Tc(V) şi Tc(IV). În acest scop se foloseşte $SnCl_2$ în soluţie acidă care reduce techneţiul conform reacţiei [301]:

$$Tc(VII) + Sn(II) \longrightarrow Tc(V) + Sn(IV) \text{ (rapidă)} \qquad (4.31)$$

În unele medii, funcţie de natura ligandului (anionul compusului organic cu care Tc va reacţiona), se poate ca techneţiul să fie încorporat în forma de valenţă Tc(V), iar în altele ca Tc(IV), reducerea techneţiului avînd loc în continuarea reacţiei de mai sus:

$$Tc(V) + Sn(II) \rightleftharpoons Tc(IV) + Sn(III)) \text{ înceată} \qquad (4.32)$$

$$Tc(V) + Sn(III) \rightleftharpoons Tc(IV) + Sn(IV)$$

În soluţii apoase speciile reduse ale techneţiului au o tendinţă foarte mare de hidroliză. Astfel Tc(IV) la pH = 2 adiţionează o grupă OH conform reacţiei [302]:

$$TcO^{2+} + H_2O \rightleftharpoons TcO(OH)^+ + H^+ \qquad (4.33)$$

sau la pH cu valori mai ridicate gradul de hidroliză creşte:

$$TcO(OH)^+ + H_2O \rightleftharpoons \underset{\downarrow}{Tc(OH)_2} + H^+ \qquad (4.34)$$
$$TcO_2 \cdot 2H_2O$$

Cercetările ulterioare [303] folosind techneţiul-99 şi metodele polarografice şi cerimetrice au arătat că în mediu de 20% HCl acidul ascorbic în prezenţă de $FeCl_3$ reduce Tc(VII) la Tc(V). În prezenţă numai de HCl concentrat (Tc(VII)) de asemenea este redus formînd un anion complex de tipul $TcCl^{2-}$. Reducerea polarografică a Tc(VII) în medii neapoase cu acetonitril a scos în evidenţă rolul apei în formarea speciilor reduse hidrolizate ale techneţiului [303] care suferă disproporţionare cu formare de specii metastabile:

$$TcO(OH)^{2+} + H_2O \begin{cases} \nearrow TcO_2(OH) + 2H^+ \\ \searrow TcO(OH)_2^+ + H^+ \end{cases} \qquad (4.35)$$

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 4.2

Tipul reacției nucleare	Tipul de generator	Avantaje și dezavantaje
U (n, f)^{99}Mo uraniu îmbogățit 30—95%	Cromatografie coloană de Al_2O_3 ce conține ^{99}Mo adsorbit de pe care se eluează ^{99m}Tc cu 0,9% NaCl	*Dezavantaje*– Necesită uraniu îmbogățit ca materie primă pentru ținte (^{235}U) care este scumpă și la fel reactoare nucleare cu flux înalt de neutroni $5 \cdot 10^{13}$n/cm^2 s. Acesta impune costuri ridicate ale produsului finit, precum și măsuri speciale de protecție pentru lucrul cu produși de fisiune. Tehnologie complexă de fabricație. Se acumulează deșeuri radioactive cu activitate înaltă a căror prelucrare impune probleme deosebite de cost sau de radioprotecție. Pericol de contaminare a ^{99m}Tc cu P.F. *Avantaje* — Se obțin concentrații radioactive foarte înalte a ^{99}Mo. Generatorii au un regim simplu de exploatare. Pot fi absorbite pe Al_2O_3 activități înalte de ^{99}Mo în volume mici, generînd activități mari de ^{99m}Tc în volume variabile funcție de regimul eluției.
^{98}Mo(n, γ)^{99}Mo	Idem	*Dezavantaje* — Se obține o concentrație radioactivă a ^{99}Mo mai mică funcție de gradul de îmbogățire a țintei (activități specifice mici din cauză că intervine concentrația chimică a molibdenului (purtătorului). Necesită ținte îmbogățite de ^{98}Mo scumpe (import) și flux înalt de neutroni în reactoarele nucleare $\approx 10^{14}$n/cm^2, s. Costuri ridicate ale ^{99m}Tc. *Avantaje* — Tehnologie simplă de fabricare a generatorilor. Rezultă deșeuri radioactive în cantitate mult mai mică. Exploatare și manipulare simplă a generatorilor.
^{98}Mo (n, γ)^{99}Mo țintă din amestec natural	Extracție cu metil-etilcetonă din soluție de 5 — 6 N NaOH. Purificare prin evaporarea MEK și filtrare pe coloană Al_2O_3	*Dezavantaje* — Necesită o aparatură mai complexă de preparare a soluției de ^{99m}Tc-pertechnetat și un personal mai calificat. Se cer măsuri de precauție în lucrul cu MEK (inflamabil). În cazul livrării la beneficiar a soluției de ^{99m}Tc-pertechnetat și nu de molibdat-^{99}Mo, raza de distribuție este mică din cauza dezintegrării ^{99m}Tc în timpul transportului. *Avantaje* — Nu necesită ținte îmbogățite de ^{98}Mo sau ^{235}U ci numai amestec natural de molibden (ieftin). Nu se impun condiții de flux de neutroni, și nici de activitate specifică mare a ^{99}Mo. Se obține o înaltă puritate chimică, radiochimică și radionuclidică a soluției de pertechnetat, randamente mari de separare a ^{99}Mo din țintele iradiate, costuri mici ale produsului finit. Se obțin cele mai înalte concentrații radioactive ale soluției de ^{99m}Tc-pertechnetat> 20—50 mCi/ml.

Reducerea technețiului, în principiu, poate avea loc în trepte. Prima treaptă de reducere este formarea Tc(VI) care în soluții este foarte instabil și disproporționează, conform reacției [303]:

$$3TcO_4^{2-} + H_2O \rightleftarrows 2TcO_4^- + TcO_3^{2-} + 2OH^- \qquad (4.36)$$

În a doua treaptă, Tc(VI) $\xrightarrow{e^-}$ Tc(V), technețiul disproporționează cu formare la fel de stări de valență stabile Tc(VII) și Tc(IV):

$$3TcO_3^- + H_2O \rightleftarrows TcO_4^- + 2TcO_3^{2-} + 2H^+$$

$$2H^+ + 2OH^- \longrightarrow 2H_2O \qquad (4.37)$$

Reducerea Tc(VII) su $SnCl_2$, în multe cazuri funcţie de pH-ul mediului, de felul cum este preparată şi păstrată soluţia de clorură stanoasă (trece uşor în formă hidrolizată coloidală), poate fi incompletă. Pentru a evita aceasta, adesea se recurge la o cantitate mai mare de agent reducător, ceea ce din punct de vedere farmacodinamic nu este recomandabil (toxicitatea staniului). În acest sens cercetările efectuate de reducere a Tc(VII) cu hidrazină (30 %) au dovedit că acest agent reducător este foarte eficient (netoxic) şi că poate fi utilizat în procesul de preparare a radiofarmaceuticelor ce conţin tehneţiu, în mediu alcalin. Mecanismul de reacţie implicat în reducerea tehneţiului este :

$$N_2H_4 + H_2O \longrightarrow N_2H_5^+ + OH^- \qquad (4.38)$$

$$N_2H_5^+ + 4OH^- \longrightarrow 4e^- + 4H_2O + H^+ \qquad (4.39)$$

$$2Tc(VII) + 4e^- \longrightarrow 2Tc(V)$$

urmată de reacţia de disproporţionare

$$3Tc(V) \longrightarrow Tc(VII) + 2\ Tc(IV)$$

sau reducere directă la Tc(IV)

$$4\ Tc(VII) + 12e^- \longrightarrow 4\ Tc(IV)$$

În cursul reducerii Tc(VII) la valenţe inferioare, s-a observat [304] că speciile hidrolizate se descompun punînd în libertate grupe OH^- şi O^- care au fost puse în evidenţă prin metoda polarografică, determinînd reacţii puternic catalitice :

$$TcO_2(OH)_3 + 2e^- \longrightarrow TcO(OH)_3 + O^-$$

$$TcO_2(OH)_3 + 3e^- \longrightarrow TcO(OH)_2 + OH^- + O^- \qquad (4.40)$$

$$OH^- + O^- \longrightarrow HO_2^- \longrightarrow H^+ + O_2^-$$

Cunoscînd mecanismele de reducere a Tc(VII) precum şi speciile reduse hidrolizate arătate mai sus se pot considera efectele majore ale hidrolizei asupra capacităţii de încorporare a Tc în radiofarmaceutice.

Prima utilizare directă în clinică a ^{99m}Tc sub formă de pertechnetat ca agent de scintigrafie a fost menţionată în literatură încă din anul 1962 [305—308]. De la acea dată şi pînă în prezent utilizarea tehneţiului ca agent pentru scintigrafia unor organe a devenit una dintre metodele cele mai larg răspîndite în practica medicală, descrisă în peste 1000 de lucrări publicate.

Obţinerea pertechnetatului de ^{99m}Tc se realizează prin una din metodele descrise mai sus şi în tabela 4.2. În această formă este frecvent utilizat ca agent de scintigrafie a tumorilor cerebrale, a glandei tiroide, a glandelor salivare, a stomacului şi în studii şi determinări ale circulaţiei sanguine [294, 309, 324] fiind administrat i.v. sau oral în funcţie de scopul propus, în doze de 1 — 10 mCi.

Scanned with OKEN Scanner

4.5.2. SERUMALBUMINĂ UMANĂ—^{99m}Tc

Serumalbumina avînd încorporat ^{99m}Tc se utilizează pentru scintigrafia pulmonară, determinări de debite sanguine şi de circulaţie şi în scintigrafia placentei [293, 320, 324, 325—330]. În ultimii ani pentru scintigrafia pulmonară ca agent scintigrafic se folosesc cu succes macroagregatele şi microsferele de serumalbumină—^{90m}Tc.

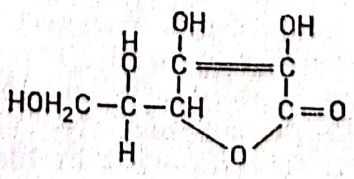
Pertechnetatul—^{99m}Tc atît în mediu acid cît şi bazic se combină într-o măsură foarte mică cu serumalbumina. Pentru a facilita încorporarea ^{99m}Tc(VII) în albumină se efectuează o reducere a anionului pertechnetat la valenţele Tc(V) sau Tc(IV), cu ajutorul agenţilor reducători, de obicei $SnCl_2$, acid ascorbic + $FeCl_3$ sau hidrazină [304]. În aceste condiţii reacţia de combinare a ^{99m}Tc redus cu albumina este rapidă atingînd un procent de încorporare a technеţiului de peste 95%. Metodele de preparare a albuminei—^{99m}Tc şi a MAA-^{99m}Tc sînt descrise în lucrările [331—336] şi au la bază reacţia de reducere a technеţiului la trepte inferioare de valenţă în mediu slab acid de soluţie tampon de fosfat de sodiu sau acetat de sodiu. În aceste condiţii serumalbumina încorporează marea parte a technеţiului redus 95%. Pentru obţinerea MAA-^{99m}Tc, serumalbumina se agregă prin încălzire 15 minute în autoclavă la 130—140°C [332] după care particulele agregate se separă de restul soluţiei ce conţine particule < 5 μm prin centrifugare (190—200 G) 2 minute. MAA după centrifugare se pot păstra circa 2 săptămîni în formă de suspensie în volum egal de soluţie 0,9% NaCl în atmosferă de azot şi în fiole etanşe. După acest timp, capacitatea de încorporare a ^{99m}Tc scade. Marcarea cu ^{99m}Tc a MAA se efectuează astfel : în fiola ce conţine MAA în soluţie de 0,9% NaCl se introduce soluţia acidă (pH ~ 1,5) de $SnCl_2$ proaspăt preparată (15 mg/100 ml) în proporţie de 1 ml la 3 ml suspensie de MAA după care se adaugă soluţia de ^{99m}Tc-pertechnetat de sodiu (5 ml), se agită 1—2 minute şi apoi se centrifughează (2 min) la 190—200 G. Supernatantul se îndepărtează iar în fiolă se introduce din nou un volum corespunzător de soluţie sterilă 0,9% NaCl. În acest fel se obţin MAA-^{99m}Tc cu o granulaţie medie de 21,5 μm, iar circa 95% dintre particule au granulaţia cuprinsă între 5 şi 80 μm şi numai 5% au peste 100 μm. De asemenea, metode de obţinere şi marcare a MAA cu ^{99m}Tc se arată în detaliu în lucrările [341, 343, 345, 346].

Prepararea microsferelor de serumalbumină umană marcate cu ^{99m}Tc se realizează în principiu după aceeaşi metodă de preparare a MAA, cu unele deosebiri descrise în lucrările [335, 337, 340, 344].

4.5.3. COMPLECŞI—^{99m}Tc

Dintre compuşii radiofarmaceutici ai technеţiului, o largă utilizare în medicina nucleară au primit complecşii cu ^{99m}Tc. Aceştia sînt folosiţi ca agenţi pentru scintigrafia renală, cerebrală, hepatică, biliară, a osului şi a tumorilor ţesuturilor moi.

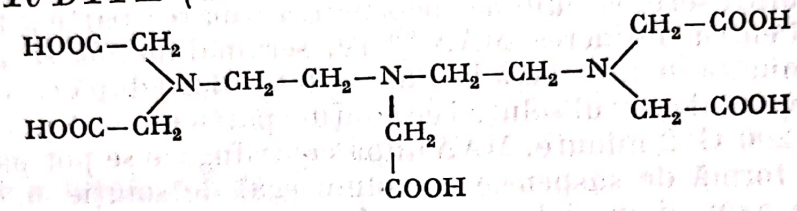
Complex ^{99m}Tc—Fe acid ascorbic. Acest complex a fost printre primii compuşi cu ^{99m}Tc şi se obţine ca urmare a reducerii Tc(VII) de către



Acid ascorbic

acidul ascorbic în prezenţă de $FeCl_3$ în mediu de HCl 2,5 N. Încă nu se poate cunoaşte bine mecanismul de complexare a Tc cu fierul, dar se presupune că Tc formează cu clorura ferică un complex stabil, deoarece fierul intrat în acest complex nu poate fi dislocuit nici chiar de reactivii specifici ai fierului ca ferocianura de potasiu [350]. Metodele de preparare a acestui complex sînt descrise în lucrările [347, 368, 351] şi care în principal se bazează pe următoarele operaţii: în soluţia de ^{99m}Tc-pertechnetat se adaugă HCl 2,5 N şi soluţie 5% de acid ascorbic în cantităţi corespunzătoare, după care se introduce soluţia de 1% clorură ferică în 1% HCl. Reacţia de complexare are loc la temperatura mediului ambiant în decurs de circa 30 minute, după care soluţia ce conţine complexul se neutralizează cu soluţia de NaOH pînă la pH ~ 7,2—7,5. Techneţiul liber necomplexat este îndepărtat prin filtrare printr-o coloană cu schimbători de ioni (anionit în forma Cl^-). Sterilizarea se face prin filtrare Millipore. Se utilizează ca agent scintigrafic în diagnosticul funcţiei renale.

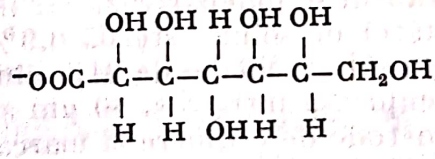
Complex ^{99m}Tc-DTPA (acid dietiltriaminopentaacetic)



DTPA

Prepararea complexului ^{99m}Tc-DTPA este descrisă în lucrările [352—354].

Complex ^{99m}Tc-glucoheptonat de staniu



Glucoheptonat

Comparativ cu complexul ^{99m}Tc-DTPA, complexul ^{99m}Tc-glucoheptonat este mult mai eficace în diagnosticul funcţiei renale. Metodele de preparare a glucoheptonatului de Sn şi ^{99m}Tc sînt descrise în lucrările [355—359] şi se bazează pe reducerea Tc(VII) la valenţe inferioare şi complexarea speciilor reduse de către glucoheptonat. Reacţia de complexare are loc în condiţii optime la pH=6—7. Încă nu se cunoaşte structura chimică a acestui complex. Complecşi similari ai techneţiului cu hidraţii de carbon se obţin şi cu gluconat şi manită utilizaţi în acelaşi scop, ca heptogluconatul de staniu.

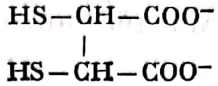
Complex ^{99m}Tc-caseidină. Datorită proprietăţilor pe care le au proteinele cu greutate moleculară 2000 — 3000 de filtrare glomerulară şi reabsorbţia lor în *tubuli*, acestea pot fi utilizate după marcarea lor cu un radionuclid, ca agent scintigrafic în determinarea funcţiei renale. Astfel de proteine între care menţionăm caseidina (polipeptidă obţinută prin hidroliza parţială a caseinei, M 2500) se folosesc tot mai frecvent în scopul menţionat. Prepararea acestui complex este descrisă în lucrările [360, 361, 368] şi metoda are părţi comune cu metodele de preparare ale altor complecşi ai

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

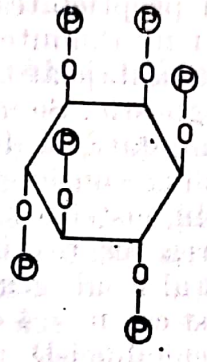
techneţiului, în care Tc(VII) este redus cu clorură stanoasă la pH = 6—7 în prezenţă de agent complexant.

^{99m}Tc-dimercaptosuccinat. Avînd la bază proprietatea chimică de complexare cu o serie de ioni ai metalelor, dimercaptosuccinatul de sodiu formează cu ^{99m}Tc un complex stabil (din punct de vedere chimic). Acest fapt permite utilizarea lui ca agent scintigrafic în determinarea funcţiei renale, fiind reţinut de cortex în proporţie de circa 50 % din activitatea totală administrată. Prepararea complexului de dimercaptosuccinat-^{99}Tc este menţionată recent în lucrările [362, 363].



Dimercaptosuccinat

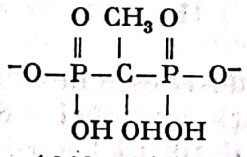
^{99m}Tc-Sn-Fitat



Fitat

Se cunoaşte că acidul fitinic şi derivaţii săi sînt buni complexanţi datorită grupărilor fosforilate din structura lor (esterii hexafosforilaţi ai alcoolilor ciclici, inositol). Folosit ca agent în scintigrafia ficatului şi a splinei, se evidenţiază prin reacţia chimică cu calciul seric cu care formează un coloid şi care este reţinut în ţesuturile hepatic şi splenic [364].

^{99m}Tc-etiliden-1-hidroxi-1,1-difosfonat



Etiliden-1-hidroxi-1,1-difosfonat

Faţă de pirofosfatul şi polifosfatul de techneţiu [366, 369, 370—372], difosfonatul are avantajul că nu este descompus aşa de rapid în procesul de metabolizare ca primii doi produşi. În prezent etiliden-1-hidroxi-1,1-difosfonatul-^{99m}Tc este tot mai frecvent utilizat ca agent scintigrafic al sistemului osos pentru detectarea tumorilor la os.

Prepararea EDHP-^{99m}Tc constă în fosforilarea acidului acetic glacial cu PCl_3 la temperatura camerei şi apoi la 5°C (în baie de gheaţă), timp de 30 minute, după care are loc o distilare a amestecului de reacţie la început (2 h) la 60°C şi în final la 120 — 130°C timp de 20—30 minute, pînă ce apar în distilat urme de acid (pH = 5). Reziduul ce rămîne după distilare este acidul care trece în sare disodică prin tratare cu NaOH [365, 366]. Despre comportarea acestui complex în organism se menţionează în lucrarea [367].

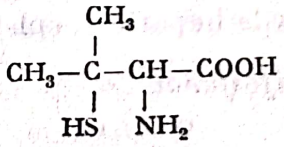
4.5.4. COLOIZI—^{99m}Tc

Dintre coloizii ce conţin ^{99m}Tc frecvent utilizaţi în diagnostic, o largă răspîndire a primit coloidul de sulf-^{99m}Tc ca agent scintigrafic al sistemului reticuloendothelian (ficat, splină). Prima dată acest coloid s-a obţinut din soluţie acidă de pertechnetat cu H_2S sub formă, probabil, de Tc_2S_7[373] în prezenţă de sulfură de stibiu, Sb_2S_3. Ulterior, metoda de preparare a coloidului de sulf cu ^{99m}Tc a fost îmbunătăţită prin faptul că H_2S şi Sb_2S_3 au fost înlocuite cu tiosulfatul de sodiu, folosind ca purtător perrenatul de sodiu [374—380]. În asociaţie cu serumalbumina coloidul de sulf şi ^{99m}Tc se utilizează şi pentru scintigrafia pulmonară [377].

4.5.5. ANTIBIOTICE—^{99m}Tc

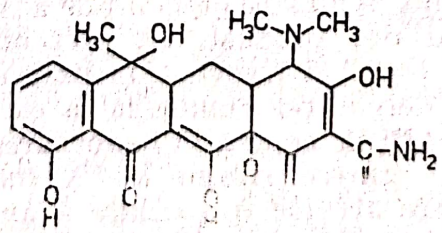
O serie de antibiotice au proprietatea de a se localiza în anumite tipuri de ţesuturi tumorale sau în anumite organe critice. În acest sens marcarea lor cu ^{99m}Tc prezintă avantaje atît din punct de vedere farmacodinamic cît mai ales pentru diagnostic. Se menţionează că dintre compuşii farmaceutici care posedă o pronunţată localizare în ficat şi apoi se elimină prin tractul biliar, sînt compuşii ce conţin grupări sulfhidril [381], printre care se situează mercaptoalcoolii, cisteina şi penicilina-D. S-a observat că pentru mercaptoalcooli reţinerea lor maximă de către ficat şi excreţia prin bilă sînt funcţie de numărul n al grupărilor $-CH_2-$ din structura lor $HO-(CH_2)_n-SH$, şi în acest caz n = 4 este considerat optim.

Marcarea cu ^{99m}Tc a penicilinei-D (β, β-dimetilcisteină) are loc prin complexarea techneţiului, prin intermediul grupărilor —SH care în prima etapă a reacţiei reduc Tc(VII) la valenţe inferioare. Speciile reduse ca Tc(V) sau Tc(IV), funcţie de condiţiile de pH şi concentraţia ligandului, formează cu penicilina-D un complex ce poate fi folosit ca agent pentru scintigrafia biliară sau renală.



Metoda de marcare a penicilinei-D este descrisă în lucrarea [382].

Tetraciclina, deşi nu conţine grupări —SH, se localizează de asemenea în vezica biliară şi în rinichi datorită legării sale de o serie de proteine şi urmare metabolizării lor se desprinde de acestea şi este eliminată prin căile biliare şi renale.



Se presupune că complexarea techneţiului de către tetraciclină are loc prin intermediul grupelor dimetil-amino şi hidroxil în mod similar cu cea a cationilor bivalenţi Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sn^{2+} etc. [383—385], după ce în prealabil Tc(VII) a fost redus cu clorură stanoasă. Separarea techneţiului rămas

necomplexat se realizează prin filtrare pe coloane cu schimbători de ioni sau gel Sephadex.

Pe lîngă utilizarea complexului de ^{99m}Tc—tetraciclină menţionată mai sus, acesta este folosit tot mai frecvent ca agent scintigrafic pentru localizarea tumorilor din ţesuturile moi şi a infarctului miocardic, avînd o deosebită afinitate de fixare în ţesuturile necrotizate.

Un bun complexant pentru ^{99m}Tc s-a remarcat a fi bleomicina. Marcarea bleomicinei cu ^{99m}Tc se poate efectua după metodele cunoscute, prin reducere cu $SnCl_2$ [386, 387] sau pe cale electrochimică [388]. Datorită proprietăţii lui remarcabile ca fiind un antibiotic antitumoral folosit cu succes în terapia tumorilor din ţesuturile moi (carcinom al epiteliilor plate), complexul ^{99m}Tc-bleomicină poate servi ca agent scintigrafic pentru detectarea şi localizarea acestui tip de tumori. Marcarea bleomicinei în afară de techneţiu şi cu alţi radionuclizi este descrisă în [389, 390].

4.6. COMPUŞI CE CONŢIN ^{113m}In şi ^{111}In

Elementul indiu a fost descoperit de Von Reich şi Richter în anul 1863 într-o mină de zinc. În stare naturală indiul conţine doi izotopi ^{113}In cu o abundenţă izotopică de 4,3% şi ^{115}In cu 95,7%. Proprietăţile chimice ale indiului sînt apropiate de cele ale galiului şi aluminiului. Obţinerea generatorului de ^{113}Sn—^{113m}In este descrisă în capitolul 2 împreună cu proprietăţile radioactive ale acestui radionuclid.

Deşi indiul este unul dintre elementele din tabelul periodic cu cea mai mare toxicitate, în cazul utilizării în medicină a ^{113m}In obţinut din generator ca produs radiofarmaceutic, concentraţia lui este extrem de mică, ceea ce este cu mult sub limita maximă admisă. Menţionăm că doza letală minimă la şoareci este de 3 mg/kg şi de 15 mg/kg la şobolani, iar un mCi de ^{113m}In conţine 0,655 ng de indiu, cantitate ce este de $9{,}1 \cdot 10^6$ ori mai mică decît doza letală la şoareci.

La fel ca şi în cazul techneţiului, problema hidrolizei în procesul de preparare a radiofarmaceuticelor ce conţin indiu devine importantă deoarece afectează procesul de complexare (legare) a indiului în compusul respectiv într-o măsură mai mare sau mai mică funcţie de gradul de hidroliză a speciilor ionice. Indiul, în stare ionică $^{113m}In^{3+}$ există numai în soluţii de acizi minerali la concentraţii (acidităţi) mai mari ale acestora. Cum de obicei condiţiile de preparare ale radiofarmaceuticelor ce conţin ^{113m}In impun condiţii blînde de pH, hidroliza indiului nu poate fi neglijată. În cele ce urmează se arată treptele mai importante ale procesului de hidroliză al $^{113m}InCl_3$ din eluatul de la generatorul de indiu [399].

$$InCl_3 \rightleftarrows InCl_2^+ + Cl^-$$

$$InCl_2^+ + OH^- \rightleftarrows In(OH)Cl_2$$

$$InCl_2^+ \rightleftarrows InCl^{2+} + Cl^-$$

$$InCl^{2+} + OH^- \rightleftarrows In(OH)Cl^+$$

$$In(OH)Cl^+ + OH^- \rightleftarrows In(OH)_2Cl \rightleftarrows In(OH)_2^+ + Cl^-$$

$$In(OH)Cl^+ \rightleftarrows In(OH)^{2+} + Cl^-$$

$$In(OH)^{2+} + OH^- \rightleftarrows In(OH)_2^+$$

$$In(OH)_2^+ + OH^- \rightleftarrows In(OH)_3$$

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, indiul în soluţii apoase de HCl diluat mai formează acvocomplecşi de forma $In(H_2O)_6^{3+}$, $In(H_2O)_5Cl^{2+}$, $In(H_2O)_4Cl_2^{+}$, $In(H_2O)Cl_3$. Toate aceste specii ionice în soluţie în prezenţa unui agent complexant se află într-o competiţie de complexare dictată de o serie de factori ca: sarcina ionică, raza ionică, gradul de hidroliză etc.

4.6.1. COMPLEX ^{113m}In—DTPA

Complexul de ^{113m}In cu acidul dietilentriaminopentaacetic (DTPA) este un produs radiofarmaceutic folosit în medicina nucleară pentru scintigrafia cerebrală. Acest complex în proporţie de 90% este eliminat din organism prin urină. Prepararea lui se realizează în laboratorul unităţii medicale şi constă din următoarele operaţii: se eluează generatorul de indiu cu 8 ml soluţie de 0,05N HCl, iar eluatul se introduce într-un flacon de penicilină. Separat, în alt flacon se pregăteşte un amestec sterilizat compus din: 1 ml soluţie DTPA de concentraţie 1,6 mg/ml, 0,1 ml acid acetic preparat din acid acetic glacial prin diluţie 1 : 100; 1 ml soluţie tampon fosfat de pH = 10,4 ce conţine 44,23 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ şi 15,93 g $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ dizolvate în 250 ml H_2O distilată, sterilă şi apirogenă. În final soluţia de eluat de ^{113m}In se introduce în flaconul ce conţine DTPA în amestecul sterilizat şi se agită cîteva secunde, după care se administrează în doze de 10 mCi [400—403].

4.6.2. COLOIZI DE ^{113m}In

Coloizii de ^{113m}In pe bază de hidroxid de fier sau gelatină, sînt reţinuţi în ţesutul reticuloendothelial în proporţie de 80—85% avînd un timp biologic de înjumătăţire de 99,5 minute, iar eliminarea completă în 30 de zile.

Prepararea coloizilor de ^{113m}In pentru scintigrafia hepatică se face în laboratorul de spital în modul următor: se eluează generatorul de indiu cu 0,05 N HCl şi se reţine o porţie de 5 ml cu activitate de circa 2—5 mCi în care se introduce o cantitate fixă de soluţie tampon de fosfat (soluţie 0,45 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 0,45 M KH_2PO_4 în proporţie de 9 : 1 cu un pH = 8) în proporţie de 1 : 0,4 astfel ca pH-ul final să fie în jur de 3,5. Se agită cîteva minute, după care se introduce o soluţie caldă de 10% gelatină în proporţie de 1 ml la 2 mCi ^{113m}In după care din nou se agită. Se obţine o soluţie coloidală opalescentă. În aceste condiţii de preparare la pH = 3,5 dimensiunile particulelor coloidale sînt mai mici şi sînt reţinute în ficat, pe cînd la pH = 6 acestea sînt cu preponderenţă reţinute în pancreas. Menţionăm că întregul proces de preparare trebuie să asigure condiţiile de sterilitate, apirogenitate şi izotonicitate a produsului respectiv.

Pentru scintigrafia pulmonară cu ^{113m}In se poate folosi de asemenea coloidul de indiu. În acest caz dimensiunile particulelor coloidale trebuie să fie mult mai mari, fapt pentru care se introduc la o porţie de 5 ml eluat de ^{113m}In 0,17 ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ preparată prin dizolvarea a 5 g clorură ferică în 100 ml H_2O distilată. Apoi pH-ul soluţiei radioactive se modifică cu 0,2 ml 10% NaOH pînă în jur de 9 cînd apare un precipitat fin de hidroxid de fier. Pentru stabilizarea coloidului se introduce 1 ml soluţie caldă de 20% gelatină şi se agită. Se obţine o soluţie de macrocoloid de

Scanned with OKEN Scanner

hidroxid de fier şi gelatină de dimensiuni 20 — 40 microni care sînt reţinuţi în proporţie de 80—90% în plămîni. Particulele cu dimensiuni mai mari de 100 microni prezintă pericol de embolism [411, 412].

4.6.3. MACROAGREGATE DE SERUMALBUMINĂ—^{113m}In

Prepararea macroagregatelor de serumalbumină umană ce conţin ^{113m}In se efectuează în mai multe trepte după cum urmează :

Într-un balon de 50 ml se introduc cîte 5 ml din fiecare din soluţiile : HCl concentrat, 0,9% NaCl şi 10% tiocianat de amoniu şi se agită cîteva secunde. În amestecul de mai sus, se introduc 10 ml de soluţie 3% serumalbumină umană, care formează un precipitat. Conţinutul flaconului se transferă într-o fiolă de centrifugă şi se centrifughează 10 minute la o viteză de 3000 rot/min. Soluţia rămasă deasupra precipitatului se decantează iar precipitatul se spală cu o soluţie 0,9% NaCl, prin agitare, obţinîndu-se o suspensie. Se ajustează pH-ul la 4,5 — 5,0 cu o soluţie de 20% Na_2CO_3. Soluţia de macroagregate de albumină astfel obţinută se introduce în flacoane de penicilină şi se sterilizează prin autoclavare 30 minute şi se păstrează în frigider la +4°C.

Marcarea cu ^{113m}In a macroagregatelor de albumină se face astfel : într-un flacon de penicilină se introduc 5 ml de eluat de ^{113m}In (0,05 N HCl) şi se aduce la pH = 5 — 7 cu soluţie 20% Na_2CO_3, după care se introduc 5 ml de soluţie de macroagregate sub agitare continuă. Amestecul obţinut se încălzeşte 20 minute în autoclavă la o temperatură de circa 110°C. După răcire, macroagregatele-^{113m}In se centrifughează şi soluţia deasupra lor se aruncă. Se introduce apoi o nouă porţie de 5 ml soluţie 0,9% NaCl, se agită şi se centrifughează şi soluţia deasupra precipitatului se aruncă. În final se introduc 10 ml de soluţie 0,9% NaCl sterilă după care se controlează pH-ul care trebuie să fie între 6—7.

4.6.4. PROTEINE PLASMATICE—^{113m}In

În soluţii acide de HCl la pH=1,5 s-a observat că ^{113m}In formează complecşi cu proteinele plasmatice.

Astfel, cu transferina [413, 414] ^{113m}In formează un complex ce poate servi la determinarea volumului sau debitului sanguin. Marcarea cu ^{113m}In a plasmei proprii a pacientului se face astfel : se eluează generatorul de indiu cu 20 ml, 0,05 N HCl şi eluatul se evaporă la sec. Reziduul se reia cu 0,5 — 1 ml soluţie de 0,01 N HCl (pH ~ 1,5) după care se sterilizează prin filtrare Millipore sau prin autoclavare. În final se introduce plasma pacientului în volum de 0,5 — 1,0 ml şi se incubează după care se administrează.

Transferina se marchează cu ^{113m}In în mod similar, dar numai că acesta se ia din flacon 50 mg (de înaltă puritate) şi care se dizolvă în 0,5 ml soluţie tampon Michaelis (pH ~ 8,6). Separat se aduce la sec un volum de 20 ml eluat de ^{113m}In care apoi se reia cu 0,5—1,0 ml 0,05 N HCl soluţie radioactivă de ^{113m}In, se adaugă peste transferina dizolvată şi se incubează, după care se sterilizează şi se administrează.

Scanned with OKEN Scanner

4.6.5. ANTIBIOTICE—^{111}In

Unele antibiotice ca bleomicina şi tetraciclinele complexează cu ^{113m}In şi ^{111}In formînd complecşi marcaţi care permit o serie de determinări ale localizării, evoluţiei şi terapiei tumorilor canceroase [417].

În aceste cazuri se preferă ^{111}In faţă de ^{113m}In deoarece primul are un timp de înjumătăţire mai mare şi energii mai adecvate unei eficienţe sporite de contorizare. Indiul-111 se produce la ciclotron [418, 419], iar marcarea bleomicinei se face prin metoda de complexare şi purificare pe răşină schimbătoare de ioni [420—421a].

4.7. COMPUŞI MARCAŢI CU ^{18}F

Dintre radioizotopii produşi la ciclotron, fluorul-18 a fost unul din primii folosiţi, date fiind proprietăţile osteotrope ale ionului de fluorură datorită încorporării în hidroxiapatită (aşa cum s-a observat în 1840 [422], dar s-a utilizat chimic abia din 1962 [423]). Sînt de asemenea favorabile timpul convenabil de înjumătăţire (110 minute, adică 2,5 ore) şi radiaţiile emise (pozitroni de energie maximă 600 keV, fotoni γ de anihilare de 510 keV). Se pot obţine la ciclotron relativ uşor activităţi mari de ^{18}F [424—428]; prepararea ^{18}F în reactoare nucleare prin iradierea carbonatului de litiu, implicînd două reacţii nucleare : ^{6}Li$(n,\alpha)t$ urmată de ^{16}O$(t,\ n)^{18}$F, duce la activităţi mai reduse [429].

Cercetările au arătat că o serie de compuşi organici marcaţi extrinsec cu ^{18}F prezintă interes biomedical, deoarece fluorul are o rază covalentă care, după hidrogen, este cea mai mică faţă de elementele uzuale : razele van der Waals sînt : 1,2 Å pentru hidrogen şi 1,35 Å pentru fluor, dar bromul şi iodul au raze van der Waals mult mai mari, 1,95 respectiv 2,15 Ångströmi*. Această asemănare între dimensiunile hidrogenului şi fluorului face ca în unele cazuri, receptorii moleculari să nu distingă hidrogenul de fluor; însă, în multe alte cazuri, electronegativitatea mare a fluorului duce la diferenţe în comportare, astfel că deşi sînt izosterice, moleculele fluorurate nu pot fi metabolizate identic; acest fapt face ca uneori moleculele fluorurate să fie antimetaboliţi ai analogilor nefluoruraţi, cum este cazul cu 5-fluorouracilul care funcţionează ca antimetabolit pentru uracil.

În ciuda acestor avantaje, marcările cu ^{18}F prezintă şi unele dezavantaje :

— sintezele sînt relativ laborioase şi destul de lungi faţă de timpul de înjumătăţire;

— randamentele reacţiilor de înglobare sînt adesea mici faţă de fluorul anorganic de la care se pleacă;

— mulţi compuşi fluoruraţi au o toxicitate atît de ridicată încît, în ciuda activităţii specifice înalte, doza injectabilă şi deci activitatea totală sînt foarte reduse. Se ştie că fluoroacetaţii alcalini sînt extrem de toxici; s-a constatat recent că şi unii aminoacizi fluoruraţi sînt otrăvuri foarte puternice, de ex. DL_{50} la (±)-3-fluorotirozină este de 7 mg/kilocorp (pe şobolan), ceea ce, cu o activitate specifică de 100 μCi/mg, duce la activităţi injectabile destul de mici.

* 1 Å $= 10^{-10}$ m.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru introducerea fluorului în molecule organice, schimbul izotopic nu se poate aplica decît rareori din cauza energiei mari de legătură C—F, iar biosinteza încă nu a fost folosită. Rămîn de aceea de discutat doar sintezele chimice şi cele radiochimice [430—435].

4.7.1. MARCAREA PRIN SINTEZĂ CHIMICĂ

Sintezele chimice se clasifică după sursa de fluor anorganic folosită şi după reacţiile chimice implicate. În general, aceste reacţii sînt substituţii ale hidrogenului, halogenilor sau grupei diazoice prin fluor, ori adiţii ale HF sau F_2 la legături multiple [436].

Acidul fluorhidric [437] se adiţionează la duble sau triple legături sau la ciclopropan, în prezenţa catalizatorilor de BF_3, CuCN sau Al_2O_3; dat fiind că alchenele superioare dau de obicei polimeri, se preferă adiţia la cloroalchene (clorură de vinil şi omologi) :

$$H_2C=CH_2 + HF \longrightarrow H_3C-CH_2F$$
$$H_2C=CHCl + HF \longrightarrow H_3C-CHFCl$$
$$F_2C=CF_2 + HF \longrightarrow F_2CH-CF_3$$
$$HC\equiv CH + HF \longrightarrow H_2C=CHF \longrightarrow H_3C-CHF_2$$
$$\text{ciclo-}C_3H_6 + HF \longrightarrow CH_3-CH_2-CH_2F$$

Unii derivaţi halogenaţi alifatici schimbă halogenul (Cl, Br, I) cu fluorul din HF la presiune şi temperatură ridicată sau în prezenţa unor catalizatori (CrF_3, $SnCl_4$) :

$$Cl_2CH-CCl_3 + HF \longrightarrow Cl_2CH-CFCl_2 + HCl$$
$$ClCF_2-CF_2Cl + HF \longrightarrow F_3C-CF_2Cl + HCl\ (+ ClCF_3)$$

Teoria legăturii C—F este demonstrată de faptul că fluorura de metil nu dă schimb izotopic cu $H^{18}F$ [438].

Toate aceste reacţii au dezavantajul că nu pot fi executate în aparatură de sticlă, ci doar de teflon sau de metal (nichel, sau metal Monel).

Fluorurile metalelor alcaline (KF, RbF, CsF) sau ale metalelor tranziţionale la valenţa inferioară (AgF, TlF, Hg_2F_2) reacţionează cu halogenurile de alchil, tosilaţi de alchil sau halogenuri de aril activate prin grupe atrăgătoare de electroni în poziţiile *orto* şi *para* faţă de halogen, înlocuind halogenul (dar nu şi hidrogenul) prin fluor; prezenţa grupelor hidroxi, ester, cian sau eter nu stînjeneşte reacţia. Fluorurile alcaline folosesc ca solvenţi Me_2N-CHO sau Me_2SO anhidre; se poate lucra şi fără solvent la temperaturi pînă la 350°, aşa cum se preferă în cazul AgF. Pentru acizii 2-fluorocarboxilici inferiori, Robinson a utilizat schimbul izotopic între acizi 2-bromocarboxilici şi o coloană cu $^{18}F^-$ fixat pe anionit; analog, 2-bromoetanolul dă 2-fluoroetanol.

$$ClCH_2-CH_2OH + KF \longrightarrow KCl + FCH_2-CH_2OH \text{ (glicerol, reflux, 5 \%)}$$
$$CCl_4 + AgF \longrightarrow AgCl + FCCl_3 \text{ (140°, fără solvent, 70 \%)}$$
$$FCCl_3 + AgF \longrightarrow AgCl + F_2CCl_2 \quad \text{" "}$$
$$2,4\text{-}(O_2N)_2C_6H_3-Cl + KF \longrightarrow 2,4\text{-}(NO_2)_2C_6H_3F + KCl \text{ (DMSO)}$$
$$ICH_2-COOH + Hg_2F_2 \longrightarrow FCH_2-COOH$$

Scanned with OKEN Scanner

Compușii $^{18}FCCl_3$ și $^{18}F_2CCl_2$ astfel obținuți [439], au fost folosiți în farmacodinamia freonului utilizat în frigiderele casnice. Pe această cale s-au putut marca extrinsec unii steroizi cu ^{18}F, înlocuind iodul cu ^{18}F din $K^{18}F$ [440] sau $Ag^{18}F$ [441]. Asemenea steroizi fluorurați au fost folosiți în vizualizarea glandelor suprarenale [442—444].

Fluorurile metalelor tranziționale la valența superioară (AgF_2, HgF_2, CeF_4, MnF_3, CoF_3) se pot obține din fluor elementar și fluorura inferioară într-un proces ciclic; ele reacționează cu hidrocarburi sau derivați halogenați alifatici ori aromatici substituind atît hidrogenul cît și halogenul prin fluor și duc adesea la perfluoroderivați, mai ales cînd reacția are loc fără solvent la 100—325°C (eventual la presiune) [439].

$$n\text{-}C_4H_{10} \xrightarrow{CoF_3} n\text{-}C_4F_{10}$$

$$\text{Naftalină} \xrightarrow{CoF_3} \text{Perfluorodecalină}$$

$$CH_3OH \xrightarrow{AgF_2} F_3C\text{—}OF$$

$$CCl_4 \xrightarrow{AgF_2} F_2CCl_2$$

Fluorurile de stibiu (reacția Swarcz), în special Cl_3SbF_2, reacționează cu derivați cloruraţi alifatici (sau aromatici cu grupe activante) substituind Cl cu F. Față de fluorurile alcaline, unele reacții decurg mai selectiv, de ex.:

$$\text{2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazină} \longrightarrow \text{2,4,6-Trifluoro-1,3,5-triazină}$$

$$\text{Hexaclorobenzen} \longrightarrow \text{1,2-Dicloro-octafluorociclohexenă}$$

$$Cl_2C{=}CCl\text{—}CCl_3 \longrightarrow Cl_2C{=}CCl\text{—}CF_3$$

Fluorurile halogenilor (ClF_3, BrF_3, IF_3) și *ale gazelor rare* (XeF_2) sînt în general foarte reactive, de aceea încă nu au căpătat o largă utilizare. Ele se obțin din elemente, iar reactivitatea fluorului elementar este într-o oarecare măsură atenuată.

Fluorul elementar este atît de reactiv încît arareori duce la produși de reacție utili; reacțiile lui cu moleculele organice duc de obicei la ruperea legăturilor carbon-carbon și la formarea perfluoroalchil-derivaților inferiori, însă la diluții mari în gazul purtător (neon) se pot obține randamente bune (teoretic pînă la 50%) în unele reacții, de ex. cu uracil rezultă 5-fluoro-uracil-^{18}F [445]. Din cauza diluției mari, chiar atomii de fluor termalizați pot da marcări utile ale unor compuși organici [446].

Acidul fluoboric HBF_4, obținut din HF și BF_3, folosește ca anion al sărurilor de diazoniu aromatice $ArN_2^+\ BF_4^-$ pentru a da o legătură între fluor și carbonul aromatic sau heterociclic (reacția Schiemann, larg utilizată) [447].

$$ArNO_2 \xrightarrow{\text{reducere}} ArNH_2 \xrightarrow[HBF_4]{HNO_2} ArN_2^+\ BF_4^- \xrightarrow[-BF_3-N_2]{100-150^\circ} ArF$$

Metoda lui Hoyte și Wolf [448] folosește ținte de $LiBF_4$ și după reacția $^{19}F(p, pn)^{18}F$, țintele sînt dizolvate în soluția apoasă de diazotare; metoda lui Silvester [425] folosește schimbul izotopic la temperatura camerei între $ArN_2^+\ BF_4^-$ și $H^{18}F$ în soluții acetonice apoase, sau în acetonitril. Randamentul maxim al reacției este de 25% față de activitatea anionului BF_4^- căci

doar unul din atomii de fluor intră în molecula organică. Înainte de diazotare, grupele auxiliare OH, NH_2, NHR şi COOH trebuie protejate prin eterificare, acilare, respectiv esterificare, iar după obţinerea fluoroderivatului, grupele protectoare trebuie îndepărtate. Prin reacţie Schiemann s-a preparat de ex. 5-fluoro-DOPA-^{18}F, pentru studii ale activităţii psihotrope [449], şi alţi compuşi psihotropi [450].

Pe această cale s-au obţinut o serie de aminoacizi aromatici marcaţi extrinsec cu ^{18}F, de ex. *p*-fluoro-fenilalanina-^{18}F, *o* şi *m*- analogii, 3-fluorotirozina, 4-, 5- sau 6-fluorotriptofanul-^{18}F, precum şi derivaţi fluoruraţi ai unor compuşi heterociclici [436, 451—453].

Agenţii de fluorurare electrofili (BF_3, NOF, AuF_3, SbF_5, $FClO_4$, F_3COF) în calitate de acizi Lewis, reacţionează cu compuşi aromatici substituind hidrogenul prin fluor, de ex. trimetileterul fluoroglucinolului dă cu $FClO_3$ în piridină 2,4,6-trimetoxifluorbenzen, iar fluorura de nitrozil NOF sau hipofluoritul de trifluorometil $F_3C—OF$ marchează steroidele selectiv, aşa cum au arătat Lambrecht, Măntescu, Fowler şi Wolf [454], cf. şi [455].

Interconversiile chimice după fluorurare permit obţinerea unei game variate de compuşi, prin tot arsenalul metodelor chimice dat fiind că legătura Ar—F nu este afectată de reduceri catalitice sau cu hidruri metalice, de halogenări homolitice ori de reacţii ale grupelor funcţionale (esterificări, eterificări, amidări, hidrolize etc.). Astfel, fluoroacetatul-^{18}F se poate reduce la 2-fluoroetanol-^{18}F [456].

4.7.2. MARCAREA PRIN SINTEZĂ RADIOCHIMICĂ

Marcarea cu ^{18}F a fluoboratului de litiu descrisă mai sus, la iradierea sa cu protoni, este de fapt o marcare prin recul ; ea are dezavantajul că nu dă produşi liberi de purtător şi că duce la soluţii apoase, aplicabile doar la reacţia Schiemann [457]. Metoda reculului nuclear a fost aplicată la marcarea cu ^{18}F a moleculelor organice, dar deşi iniţial s-au obţinut unele rezultate încurajatoare [458—460], cercetările au arătat că degradările radiochimice sînt atît de avansate, iar randamentele de încorporare atît de mici, încît în ciuda simplităţii metodei, ea a fost abandonată.

Cu toate că în prezent folosirea fluorurii-$^{18}F^-$ în diagnosticul afecţiunilor osoase [461] s-a redus ca urmare a introducerii complecşilor fosforici ai technetiului-99m, acest fapt provine nu atît din superioritatea ^{99m}Tc, cît din accesibilitatea mai redusă a ^{18}F (produs la ciclotron) şi din faptul că deocamdată numărul camerelor de scintilaţie adaptate emisiei pozitronice şi fotonilor de anihilare este încă foarte redus.

Domeniile de utilizare a compuşilor organici marcaţi cu ^{18}F sînt scintigrafia pancreasului [451] (unde 6-fluorotriptofanul - ^{18}F concurează cu selenometionina-^{75}Se), trasarea căilor metabolice (cu aminoacizi, baze purinice şi pirimidinice [462] sau steroide fluorurate), localizarea unor tumori (cu 6-fluorotriptofan-^{18}F [463]), cercetarea „clearance"-ului sanguin, a funcţiei cardiace şi a perfuziei cerebrale (cu 2-fluorocarboxilaţi sau 2-fluoro-etanol [464]), cercetări de farmacodinamie şi de ventilaţie pulmonară (cu freoni) [439], studii ale funcţiilor endocrine (cu steroide fluorurate [440]), şi în special studii dinamice ale proceselor metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

4.7.3. RADIOIZOTOPII CLORULUI, BROMULUI ŞI ASTATINIULUI

Deşi ceilalţi halogeni (Cl, Br, At) au fiecare mai mulţi radioizotopi, ei nu şi-au cucerit în medicina nucleară sau în marcările biochimice un loc comparabil cu al radioizotopilor iodului sau cu al fluorului-18.

Dintre utilizările compuşilor marcaţi cu ^{82}Br [465, 466] amintim sintezele unor agenţi psihotropi [467, 468] şi ale 2-bromo-α-ergocriptinei-^{82}Br, un medicament folosit la tratamentul Parkinsonismului [469]. S-au marcat extrinsec cu ^{77}Br pe cale enzimatică folosind cloroperoxidaza, unele proteine [470], iar dintre aminoacizi s-a obţinut L-tirozina-^{77}Br [471]. Alte utilizări ale ^{77}Br sînt pentru dozarea apei extracelulare şi a clorurilor din organism [471, 472].

Aşa cum îl arată şi numele, elementul $_{85}$At nu are izotopi stabili, viaţa cea mai lungă fiind a ^{210}At ($T_{1/2}$ = 8,3 h) şi a ^{211}At ($T_{1/2}$ = 7,2 h). Ambii nuclizi emit particule α şi dau captură electronică. Astatiniul-211 se prepară la ciclotron prin reacţie ^{209}Bi(α, 2n) şi se transformă în astatinură ^{211}At$^-$.

Studiile captării ionului anorganic ^{211}At$^-$ au arătat o oarecare îmbogăţire în tiroidă [473,474], în tumori [475], precum şi embriotoxicitate [476], majoritatea astatiniului anorganic fiind însă distribuit nespecific în organism [473]. De aceea, s-a trecut la folosirea compuşilor organici marcaţi extrinsec cu ^{211}At pentru localizarea în organe specifice.

Se speră că localizarea nucleozidelor marcate cu ^{211}At în tumori va permite terapia cu radiaţii α a unor forme de cancer [477], precum şi suprimarea mecanismelor de apărare imunologice care provoacă rejecţia grefelor ; în acest scop, se administrează antigeni marcaţi cu ^{211}At [478—481].

4.8. CARBONUL-14, RADIOCARBONUL DE VIAŢĂ LUNGĂ

Cele două „epoci de aur" ale descoperirii radioizotopilor au urmat scurtă vreme după ce E.O. Lawrence a construit, în 1929, primul ciclotron, şi după ce E. Fermi a construit, în 1945, primul reactor nuclear. Carbonul-11 a fost descoperit în 1934 la ciclotron. În ciuda căutărilor din anii următori, nu s-a găsit vreun alt radioizotop al carbonului, de aceea se credea că un asemenea radioizotop nu există, sau are timpul de înjumătăţire foarte scurt. A constituit o mare surpriză descoperirea de către Kamen în 1940, tot la ciclotron, a ^{14}C cu o viaţă de ordinul miilor de ani.

Primele aplicaţii au fost efectuate în măsură aproape egală cu ^{11}C şi cu ^{14}C, iar primele ediţii ale cărţii lui Kamen [482], precum şi ale monografiei consacrate radiocarbonului [483], descriu amplu atît ^{11}C cît şi ^{14}C. Apoi ^{14}C a putut fi preparat mai uşor la reactor, iar aplicaţiile carbonului-11 au scăzut între anii 1950 şi 1970 practic la zero. În ediţia a treia a cărţii lui Kamen, din 1957 [482], carbonul-11 nu mai are un capitol separat, declarîndu-se că „el a fost folosit în trecut dar acum nu mai are decît un interes istoric". Pînă în 1976 au mai apărut capitole în monografii [484] şi trei cărţi dedicate exclusiv carbonului-14 [485—487].

După 1970, însă, din cauza calităţilor sale, carbonul-11 a suferit un reviriment şi astăzi este din ce în ce mai folosit, în ciuda costului său ridicat şi a necesităţii de a avea un ciclotron în apropierea spitalului.

Scanned with OKEN Scanner

O situație analoagă întrucîtva s-a petrecut în privința radioizotopilor hidrogenului, crezîndu-se pînă în 1939 că hidrogenul, ca celelalte „elemente organogene" C, N și O nu are radioizotopi de viață superioară minutelor. Aproape simultan cu descoperirea ^{14}C, s-a descoperit și tritiul, la ciclotron, astfel că din fericire, există radioizotopi utili pentru C și H; doar N și O nu au decît radioizotopi de viață foarte scurtă, de aceea pentru marcări cu aceste elemente trebuie folosiți izotopii stabili ai azotului și oxigenului.

4.8.1. OBȚINEREA CARBONULUI-14

Reacția $^{14}N(n, p)^{14}C$ se realizează iradiind în reactoare de flux înalt, timp îndelungat (cca. 2 ani), combinații ale azotului; la un flux de $10^{14}n/cm^2 \cdot s$, dintr-un gram de azot rezultă 25 mCi de ^{14}C pe an. În practică se folosesc nitrura de beriliu (toxică, scumpă) sau de aluminiu (cu un conținut mai redus de azot) preparate special așa ca să conțină cît mai puțin carbon natural care ar micșora activitatea specifică. Se poate obține astfel carbon-14 sub formă de $^{14}CO_2$ care este apoi transformat în carbonat de bariu, cu o abundență izotopică de aprox. 80 $\%$ ^{14}C.

Toate metodele de încorporare a carbonului-14, afară de recul nuclear, pleacă de fapt de la $Ba\,^{14}CO_3$. Din cauza timpului de înjumătățire lung al carbonului-14 și a secțiunii de reacție mici a azotului-14, iradierile ce durează ani de zile în reactoare de flux ridicat sînt scumpe, iar acest lucru se reflectă în costul carbonatului de bariu-^{14}C. În plus, dintr-o cantitate dată de carbon-14 nu se valorifică decît o mică parte a radioactivității înmagazinate în el, pe care o va emite timp de zeci de mii de ani, dar care a trebuit plătită.

Carbonul-14 este probabil radioizotopul cu cele mai ample, numeroase și variate utilizări dintre toți radioizotopii cunoscuți [485]. Se prepară și se vînd curent mii de compuși marcați cu ^{14}C. Pentru ușurarea accesului la enorma literatură științifică, s-au editat numeroase cataloage, bibliografii și cărți referitoare la carbonul-14: [483—487].

Culegerea de sinteze organice cu radioizotopi a lui Murray și Williams, în două volume, este împărțită grăitor: volumul I este consacrat carbonului-14, iar volumul II este consacrat tuturor celorlalți radioizotopi [488]. Se mai pot menționa bibliografiile lui Nevenzel [489], precum și diferite referate de ansamblu [490—492] sau cărți [493, 494] despre aplicațiile carbonului-14 în chimia organică.

Dintre cele patru metode generale de încorporare a radioizotopilor, schimbul izotopic arareori se poate aplica la marcările cu ^{14}C, iar sintezele radiochimice prin recul dau rezultate nesatisfăcătoare. De aceea se practică cel mai adesea marcarea cu ^{14}C prin sinteză chimică. În cazul unor compuși cu structură complicată, ce se pot obține mai ușor pe cale biologică, se recurge uneori la biosinteze.

Marcarea cu ^{14}C prin sinteză chimică. Aceasta este metoda de bază pentru marcările cu carbon-14 deoarece atomii de carbon alcătuiesc „coloana vertebrală" a moleculei, care trebuie formată pas cu pas, plecînd de la $Ba^{14}CO_3$. Din această cauză s-a dezvoltat un capitol special al sintezei organice care trebuie să răspundă următoarelor cerințe:

— să obțină produsul dorit, marcat în locul dorit cu atomul de ^{14}C provenit din $Ba^{14}CO_3$,

Scanned with OKEN Scanner

— sinteza să aibă un număr redus de etape pentru ca randamentul, raportat la $Ba^{14}CO_3$, să fie cît mai înalt,

— din același motiv, se preferă sintezele la care marcajul este introdus cît mai tîrziu,

— să se poată lucra cu cantități reduse de substanță, corespunzînd unor activități totale de pînă la 50 mCi,

— să se țină seama că randamentele anumitor etape sau purificări pot fi mărite prin introducerea de purtător în cantități adecvate, reducîndu-se în consecință corespunzător activitatea specifică.

Reacții primare ale $^{14}CO_2$. Carbonatul de bariu, $Ba^{14}CO_3$, se tratează cu acizi (de obicei H_2SO_4 sau H_3PO_4 anhidri, nevolatili) punînd în libertate bioxidul de carbon-^{14}C care este ușor de manipulat într-o instalație de vid, fiind condensat și solidificat în locul și vasul dorit prin răcire cu azot lichid.

Reacțiile ulterioare principale ale bioxidului de carbon - ^{14}C sînt:

1) transformarea într-un acid carboxilic RCOOH prin carboxilarea unui derivat organometalic de litiu (RLi) sau unui compus Grignard (RMgX);

2) transformarea în cianură de potasiu sau sodiu (aceasta se poate obține și prin schimb izotopic între $Ba^{14}CO_3$ și KCN);

3) transformarea în cianamidă de bariu prin încălzirea la 850° a $Ba^{14}CO_3$ în atmosferă de amoniac;

4) reducerea la metanol cu $LiAlH_4$;

5) reducerea la acid formic hidrogenînd catalitic bicarbonați alcalini;

6) reducerea la oxid de carbon prin încălzire cu pulbere de zinc;

7) transformarea în acetilenă prin încălzirea $BaCO_3$ cu bariu metalic și descompunerea cu apă a carburii BaC_2 formate;

8) transformarea în metan prin reducere catalitică.

Aceste reacții primare, numerotate ca mai sus, sînt ilustrate în figura 4.2 (unde toți atomii de carbon arătați sînt ^{14}C), împreună cu cîteva reacții secundare.

Sintezele bazate pe acetilenă marcată sînt dificile din cauza necesității de a manipula gaze radioactive. De aceea, pentru a obține derivați ai benzenului se preferă căile arătate în figura 4.3 [492].

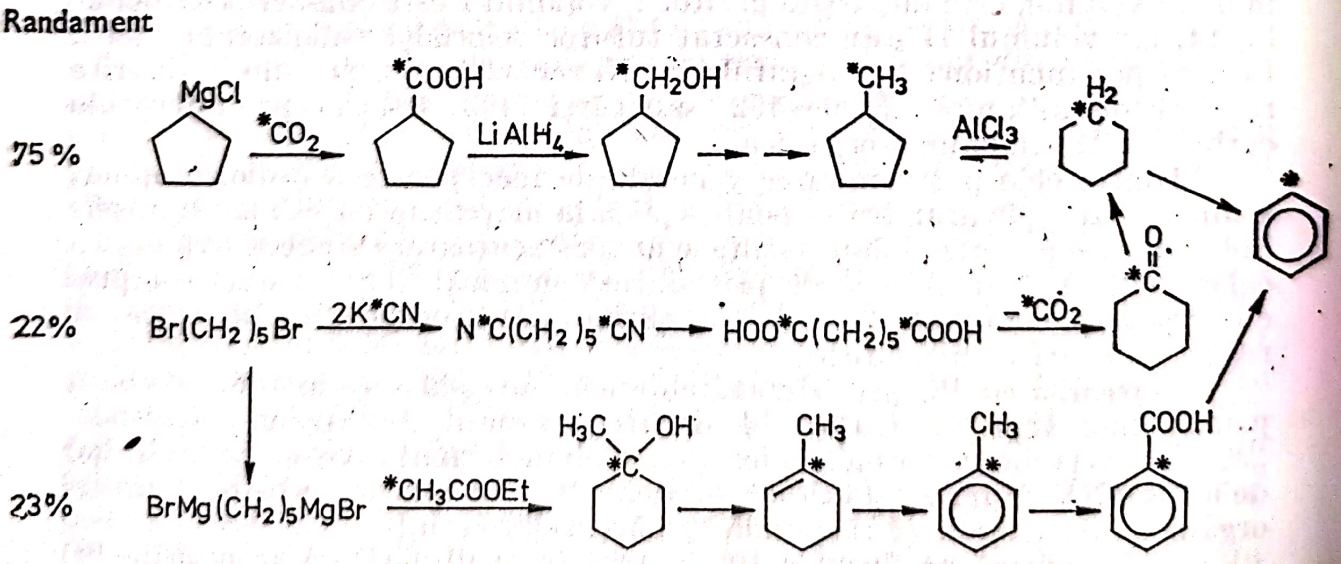


Fig. 4.3. — Metode de obținere a benzenului marcat cu carbon-14.

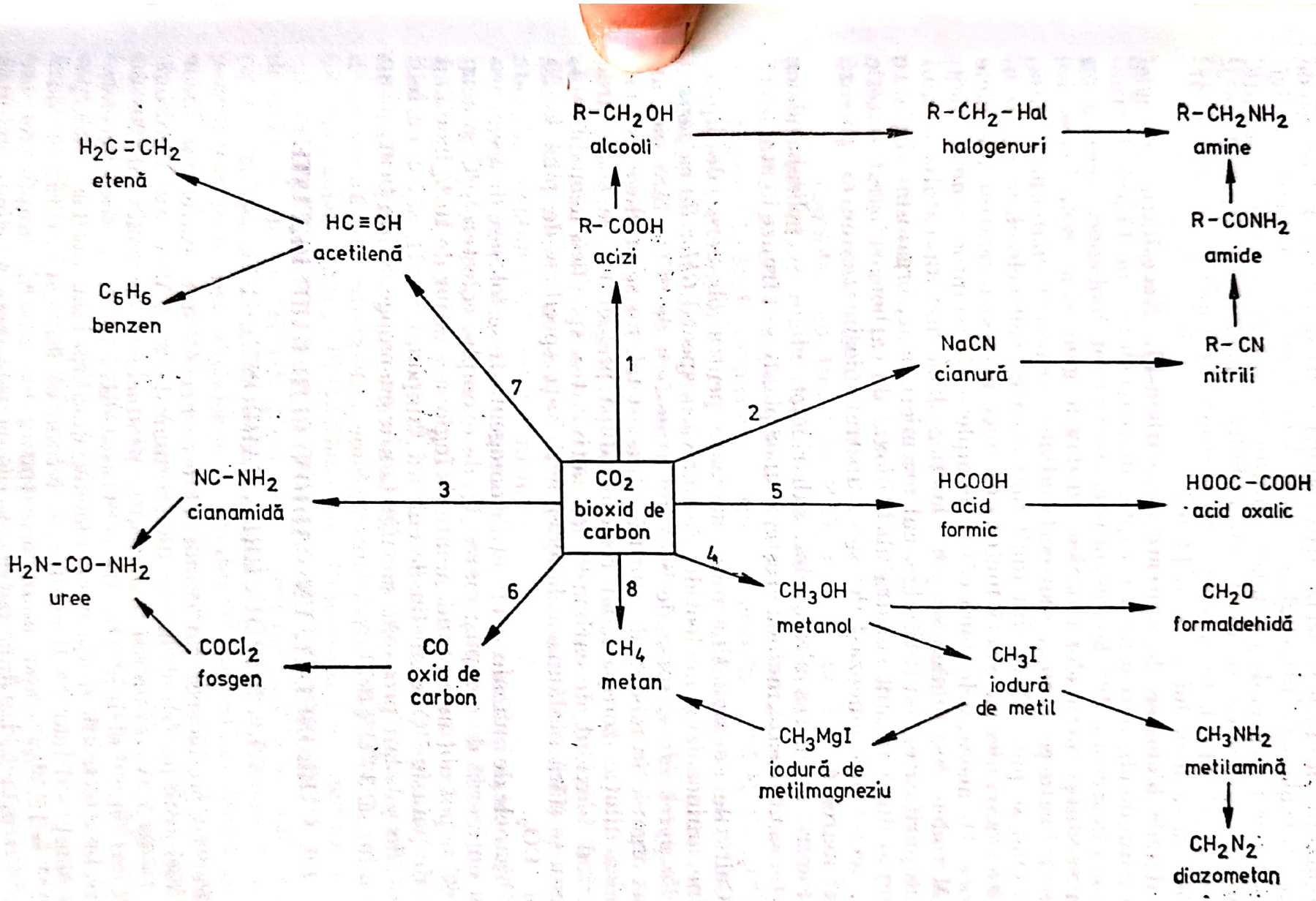


Fig. 4.2—Sinteze de compuși marcați cu carbon-14 plecînd de la bioxid de carbon-^{14}C.

Scanned with OKEN Scanner

Alte metode de marcare cu carbon-14 (schimb izotopic, recul). Metoda *schimbului izotopic* nu se poate aplica, din păcate, decît în cazuri excepționale : unul a fost amintit la prepararea cianurii marcate. Asemenea reacții de schimb izotopic sînt utile adesea, atunci cînd nu sînt necesare activități specifice ridicate, de ex. pentru obținerea anhidridei acetice marcate, reacționînd acetat de sodiu-^{14}C cu anhidridă acetică și dsitilînd anhidridă marcată [495]. Interesant este schimbul izotopic dintre acizii carboxilici sau sărurile lor și $^{14}CO_2$ [496].

Metode biologice de marcare cu carbon-14. Necesitățile biologiei și medicinii de obținere a unor compuși marcați cu carbon-14 avînd structuri complicate, au dus la dezvoltarea metodelor biologice. Acestea nu au generalitatea metodelor chimice, nu dau în general activități specifice atît de ridicate ca acelea, nici certitudinea localizării marcajului, însă, atunci cînd se pot aplica, sînt mult mai ușoare decît cele chimice, iar în anumite cazuri nici nu există metode chimice care să concureze metodele biologice. De aceea, cele două căi se completează reciproc în mod fericit.

Metodele biochimice se pot clasifica după natura catalizatorului (enzime purificate, țesuturi, alge, culturi microbiene, organisme și plante intacte) și după natura substratului (bioxid de carbon, substrat sintetic de ex. acetat ori glucoză-1-^{14}C sau substrat biosintetic, de ex. glucoză general marcată).

Pentru obținerea alcaloizilor, zaharidelor, oligo- și polizaharidelor marcate, se utilizează metoda creșterii unor plante sau frunze în atmosferă de $^{14}CO_2$.

Culturile de alge sînt mult utilizate pentru obținerea de lipide, proteine, aminoacizi și nucleotide. Se cultivă în special *Chlorella vulgaris* și *Chlorella pyrenoidosa*, sursa de ^{14}C fiind atmosfera de $^{14}CO_2$, fără nici un compus organic în mediul de cultură. În acest fel, nu se produce nici cea mai mică diluție izotopică, iar reziduul după prelucrare se poate arde regenerînd bioxidul de carbon-^{14}C cu activitatea specifică nemodificată, tolerîndu-se (fără a dăuna celulelor) activități specifice de pînă la 20 Ci/mol CO_2.

Organele de animale sau fracțiile omogenizate se folosesc de asemenea pentru obținerea de compuși marcați ; de exemplu, colesterol-^{14}C și acizi grași-^{14}C se pot obține cu randamente de înglobare în jur de 10 % incubînd acetat de potasiu-^{14}C în mediu de cultură tamponat la pH = 7,2 cu felii de ficat de șobolan proaspăt sacrificat, sau cu omogenat de ficat, timp de 45 min la 37°C [497].

4.9. CARBONUL-11, UN RADIONUCLID CARE RENAȘTE

4.9.1. PRODUCEREA CARBONULUI-11

Pentru producerea carbonului-11 este necesar un accelerator liniar ori un ciclotron pentru obținerea deuteronilor de 2—5 MeV sau a protonilor de 4—10 MeV, ori un betatron pentru producerea electronilor de 20—30 MeV. Cum timpul de înjumătățire al ^{11}C este de 20 minute, aceste acceleratoare trebuie să se afle în apropierea locului unde radionuclidul este încorporat în compusul marcat și utilizat, dat fiind că după o oră rămîne doar $100 \cdot 2^{-3} = 12{,}5\%$, după două ore $100 \cdot 2^{-6} = 1{,}56\%$, după trei ore $100 \cdot 2^{-9} = 0{,}19\%$, iar după patru ore $100 \cdot 2^{-12} = 0{,}024\%$ din activitatea inițială.

Scanned with OKEN Scanner

Ţinînd însă seama de activităţile specifice enorme care se obţin, se poate lucra pentru aplicaţii biomedicale timp de 3 ore după obţinerea nuclidului, iar pentru aplicaţii chimice chiar timp de 4 ore.

Acest timp de înjumătăţire este un avantaj din punctul de vedere al utilizării *in vivo*, dar în acelaşi timp pune probleme economice (amplasarea teritorială a acceleratoarelor) şi chimice (punerea la punct a unor metode rapide de sinteză şi purificare).

Dezintegrarea carbonului-11 produce pozitroni cu energie maximă de 0,97 MeV, care sînt reţinuţi de o folie de aluminiu de 400 $\frac{mg}{cm^2}$. Ei se transformă în fotoni γ de anihilare de 0,511 MeV. De aceea, spre deosebire de ^{14}C, carbonul-11 poate fi detectat de la distanţă şi deci poate fi folosit pentru vizualizarea internă. Utilizarea lui este abia la început, iar perspectivele sînt foarte încurajatoare.

Pentru producerea carbonului-11 se folosesc patru reacţii nucleare [498—507]:

1) $^{10}B(d, n)^{11}C$, folosind ţinte de B_2O_3 îmbogăţite în ^{10}B, bombardate cu deuteroni (reacţia are pragul zero şi o secţiune eficace maximă la ~ 4 MeV). Prin topirea trioxidului de bor, gazele (^{11}CO, $^{11}CO_2$) sînt puse în libertate şi antrenate de un curent de gaz inert.

2) $^{11}B(p,n)^{11}C$, cu ţinte de B_2O_3 natural bombardate cu protoni (reacţia are prag de 3,02 MeV şi secţiune eficace maximă la 9,4 MeV).

3) $^{14}N(p, \alpha)^{11}C$, cu ţinte de azot gazos bombardat cu protoni (reacţia are prag de 3,13 MeV şi maximul secţiunii eficace la ~ 7,5 MeV).

Cele trei reacţii de mai sus sînt cele mai folosite; ele au secţiuni eficace maxime de 0,2—0,36 barni.

4) $^{12}C(\gamma, n)^{11}C$, cu ţinte de carbon poros bombardate cu fotoni energici (Bremsstrahlung prin frînarea electronilor acceleraţi în betatron). Reacţia fotonucleară are un prag de 18,7 MeV, şi prin recul poate duce la un carbon-11 cu o activitate specifică acceptabilă; spre deosebire de reacţiile anterioare, aici produsul este un izotop al ţintei, de aceea activitatea specifică în absenţa reculului este mult mai mică.

Din reacţiile nucleare, atomii de carbon rezultaţi apar sub formă de ^{11}CO, prin reacţie primară cu oxigenul din B_2O_3 sau din azotul gazos care conţine aprox. 1 ppm O_2. Prin radioliza acestui ^{11}CO se formează, într-o reacţie secundară, $^{11}CO_2$. Gazele formate sînt antrenate într-un curent de gaz inert (cu eventuale urme de CO sau CO_2 ca purtător) şi, după dorinţă, separate în $^{11}CO_2$ condensabil în azot lichid şi ^{11}CO necondensabil, ori oxidate total la $^{11}CO_2$ [508]. În alte metode, ţinta de azot gazos se diluează cu H_2, cînd jumătate din carbonul-11 format rezultă sub formă de acid cianhidric $H^{11}CN$ [509—511]. Întrucît multe sinteze organice rapide utilizează ca materie primă cianurile, s-au pus la punct şi metode pentru transformarea celeilalte jumătăţi din ^{11}C degajat sub formă de oxizi ai carbonului, tot în HCN: se poate sintetiza $H^{11}CN$ din $^{11}CO_2$ cu potasiu metalic şi amoniac gazos la temperaturi ridicate [512]. Este însă mai convenabilă sinteza prin intermediul $^{11}CH_4$, trecut cu NH_3 peste un catalizator de platină la 1000°C [513]. Din $^{11}CO_2$, prin $Ba^{11}CO_3$ se obţine $Ba^{11}C_2$ care duce la acetilenă [512]. Pe aceste căi se obţin activităţi de ^{11}C sub formă de ^{11}CO, $^{11}CO_2$ şi $H^{11}CN$ de ordinul zecimilor pînă la zecile de curie, cu activităţi specifice 1—10% din cele maxime teoretice de $9{,}3 \cdot 10^9$ Ci/mol. Este greu de evitat prezenţa urmelor de carbon în ţintele supuse iradierii la ciclotron, de aceea chiar fără adăugarea intenţionată de purtător, nu se

Scanned with OKEN Scanner

obţin activităţile specifice maxime. Din acest motiv, trebuie făcută distincţia între expresia „fără purtător" indicînd un radionuclid cu activitatea maximă posibilă, şi „fără adaos de purtător" indicînd un radionuclid care poate avea activităţi specifice mai reduse din cauza unor impurităţi accidentale neintenţionate [513].

Se poate utiliza direct $^{11}CO_2$ pentru studii ale funcţiei pulmonare [514, 515]. Marcarea eritrocitelor cu ^{11}CO permite măsurarea volumului sanguin [516], masei de globule roşii din splină [517], studii de supravieţuire a globulelor roşii [518], şi localizarea placentei [519] (în ultimul caz, diagnosticul *placentei praevia* se poate face prin simplă inhalare de ^{11}CO, o metodă care concurează cu succes metoda ultrasonică [520]).

4.9.2. COMPUŞI MARCAŢI CU ^{11}C

Ca şi la carbonul-14, marcajul cu ^{11}C este totdeauna un marcaj intrinsec. Legăturile carbonului sînt stabile.

Dintre marcările efectuate pînă în prezent cu ^{11}C se vor menţiona numai cele mai semnificative.

Ca şi la compuşii marcaţi cu ^{14}C, se vor discuta separat sintezele chimice, apoi biosintezele (schimbul izotopic neavînd deocamdată aplicaţii, iar metodele radiochimice fiind de aplicabilitate foarte restrînsă).

Din cele trei materii prime (^{11}CO, $^{11}CO_2$ şi $H^{11}CN$) se poate obţine prin sinteză chimică rapidă (timpul fiind limitat la circa 2 ore) o mare varietate de compuşi radiofarmaceutici. Reducerea $^{11}CO_2$ cu $LiAlH_4$ duce la $^{11}CH_3OH$ care, după transformarea în $^{11}CH_3I$, se foloseşte pentru metilări — de ex. iodmetilatul N-metil (^{11}C)-clorpromazinei [521] (timp de sinteză 50 minute, activitate specifică finală 125 Ci/mol) folosit pentru studiul dinamic rapid al metabolismului în şobolani. Ulterior, clorpromazina ca atare a fost şi ea marcată cu ^{11}C [522, 523]. Pentru metilări cu $^{11}CH_3$ o altă metodă este formilarea reductivă plecînd de la formaldehida $^{11}CH_2O$ preparată prin oxidarea $^{11}CH_3OH$ [524]. Dopamina-^{11}C [523], iododopamina-^{11}C [526] şi norepinefrina-^{11}C [527] (durata sintezei o oră, randament chimic şi radiochimic 10—15%) au fost obţinute prin reacţie cu cianură-^{11}C; în aceste sinteze s-a lucrat fără purtător obţinîndu-se activităţi specifice de ordinul 10^6 Ci/mol. Afară de cei citaţi mai sus, au fost obţinuţi şi alţi agenţi psihotropi în vederea studiului farmacocinetic, şi anume cafeina-^{11}C şi diazepamul-^{11}C, plecînd de la iodura de metil-^{11}C.

Acizii carboxilici graşi marcaţi la carboxil cu ^{11}C, obţinuţi prin carbonatarea derivaţilor organometalici [528—532] sau prin hidroliza nitrililor, au fost folosiţi pentru vizualizarea organelor la om: majoritatea carboxilaţilor alifatici inferiori se acumulează în ficat şi rinichi, fiind excretaţi în bilă şi urină; ei nu pătrund în creierul normal dar apar în tumorile craniene; ei prezintă interes pentru localizarea şi precizarea infarctului miocardic [532]; palmitatul-carboxil-^{11}C a fost folosit pentru tomografie transaxială prin emisie pozitronică.

Nitrilii, obţinuţi plecînd de la cianură-^{11}C şi derivaţi halogenaţi, fiind liposolubili, se acumulează în membranele celulare apărînd la cîine în creier, ficat şi rinichi. Tot în creier apar la cîine după administrare intravenoasă şi o serie de derivaţi hidantoinici marcaţi (de ex. dilantina) cu ^{11}C, produşi prin reacţia cetonelor corespunzătoare cu acid cianhidric-^{11}C şi cu carbonat de amoniu folosind alcoolul sau dimetilsulfoxidul apoşi drept solvent [533, 534].

Scanned with OKEN Scanner

Prin reducerea nitrililor cu $LiAlH_4$ se obţin amine alifatice-^{11}C utile în studii pulmonare şi de metabolism, deschizînd posibilitatea explorărilor dinamice *in vivo* [535].

Biosinteza compuşilor marcaţi cu ^{11}C începe cu studiile de fotosinteză a $^{11}CO_2$ efectuate în 1939 de Ruben, Hassid şi Kamen [536] şi continuă mai recent cu biosinteza ^{11}C-glucozei [537] şi acidului L-aspartic-4-^{11}C [538]. În toate aceste metode se foloseşte $^{11}CO_2$ drept materie primă. Cu substrat sintetic (^{11}C-timină marcată la metil) şi cu timidilat-sintetaza cristalizată s-a realizat sinteza enzimatică a ^{11}C-timidinei [539]. Prezintă perspectivă largă de utilizare pentru ^{11}C, metodele care folosesc enzime insolubilizate, căci sînt simple, rapide şi foarte eficiente.

Se va menţiona o singură reacţie radiochimică prin recul de carbon-11, şi anume prepararea [540, 541] materiei prime pentru sinteze, care este cianura de sodiu-^{11}C : iradierea cu protoni a cianurii de sodiu la ciclotron produce ^{11}C prin reacţia nucleară $^{14}N(p, \alpha)^{11}C$, iar nucleele de ^{11}C după ce suferă reculul deslocuiesc alte nuclee de ^{12}C din cianura nemarcată, ducînd la cianură marcată ; activitatea specifică este redusă de prezenţa excesului de cianură nemarcată, de aceea pentru utilizări biomedicale se preferă obţinerea cianurilor din acidul cianhidric $H^{11}CN$ preparat aşa cum s-a arătat mai înainte.

În concluzie, asistăm la renaşterea, petrecută după 1970, în folosirea ^{11}C pentru radiofarmaceutice de o mare varietate. În ciuda timpului de înjumătăţire scurt (care este însă un avantaj din punctul de vedere al utilizării pe om căci duce la iradieri de durată comparabilă cu durata examenului clinic), se pot efectua numeroase sinteze ori biosinteze rapide, şi ţinînd cont de activităţile specifice uriaşe ce pot fi obţinute*, se poate ajunge la activităţi convenabile în momentul utilizării. Această utilizare este în principal de două tipuri : pentru studii farmacocinetice (determinarea localizării şi metabolizării diferitelor substanţe) şi pentru vizualizarea organelor normale sau patologice. Desigur, ^{11}C este un radioizotop încă scump care necesită existenţa unui accelerator în apropiere, iar studiile dinamice reclamă aparatură de detecţie adecvată.

4.10. TRITIUL, RADIOIZOTOPUL HIDROGENULUI

4.10.1. OBŢINEREA ŞI UTILIZĂRILE TRITIULUI

Celui mai simplu (număr atomic 1), uşor (masa atomică 3) şi ieftin radioizotop i s-au dedicat mai multe cărţi [542—546], bibliografii [547—551] şi simpozioane [552—554].

Tritiul se obţine prin iradierea în reactoare nucleare cu flux ridicat de neutroni ($\sim 10^{14}$ n/cm^2 · s) a litiului-6 îmbogăţit, sub formă de aliaj cu magneziu ori aluminiu, sau a unor compuşi de litiu, de ex. fluorura. Reacţia nucleară care are loc este $^6Li(n, \alpha)^3T$. O parte din tritiu iese prin recul ca tritiu gazos, altă parte este reţinută în solid de unde este eliberată prin reacţii chimice. Se obţine tritiu gazos, fără purtător, de înaltă activitate specifică (50—58 kCi/mol), care trebuie manipulat cu grijă, date fiind activităţile mari, de ordinul zecilor-miilor de curie. Un curie de tritiu gazos de activitate speci-

---

* Conform tabelei 3.2, activitatea specifică maximă a ^{11}C este de aproape 10^{10} Ci/atom-gram.

Scanned with OKEN Scanner

fică maximă cîntăreşte 0,1 mg şi ocupă la presiune normală un volum de 0,4 ml.

Principala aplicare tehnică a tritiului o constituie sursele autoluminescente, în care tuburi de sticlă acoperite cu un strat fin de sulfură de zinc sînt umplute cu tritiu gazos [555].

Amplele utilizări ale tritiului în hidrologie sau în chimie nu vor fi detaliate aici, ci se vor menţiona pe scurt utilizările în biologie şi medicină.

Se poate face o paralelă între izotopii hidrogenului şi ai carbonului, cele două elemente cheie ale compuşilor organici :

— ambele elemente conţin doi nuclizi stabili, din care cel mai uşor apare în mare exces ;

— ambele elemente au un radioizotop de viaţă lungă, emiţător beta minus (fără γ), cu energie joasă a radiaţiei β ;

— din păcate, nici unul din aceste elemente nu are un radioizotop gamma-activ de viaţă medie (de ordinul orelor sau zilelor, cum este cazul iodului-123, iodului-131 sau iodului-125), ceea ce ar fi fost excelent pentru utilizarea clinică în vizualizări de organe ;

— doar carbonul are un radioizotop β^+ activ, ^{11}C, cu un timp de înjumătăţire relativ scurt (20 minute).

— radiaţia β moale nu permite decelarea din afara organismului, de aceea ^{14}C şi ^{3}H nu pot fi folosiţi pentru vizualizări de organe.

În prezent, tritiul se foloseşte mult în cercetarea biologică şi puţin în medicina clinică. Apa tritiată figurează deja în unele farmacopei ; ea a fost folosită pentru determinarea conţinutului în apă al corpului la animal [556] sau la om [557—558] (60% la bărbaţi, 58% la femei [559]) dar astăzi se preferă alte metode. Tritiul gazos a fost folosit pentru diagnosticul afecţiunilor respiratorii [560] dar actualmente este înlocuit cu gaze rare. Acidul folic tritiat a fost folosit pentru diagnosticul anemiei megaloblastice [561—563].

Datorită parcursului foarte scurt al radiaţiei β emise de tritiu, acest radioizotop şi-a cîştigat locul de frunte în studiile de microautoradiografie [564—567] pentru localizarea compuşilor chimici în componentele celulelor, pentru precizarea replicării ADN-ului (în special cu timidină tritiată [568]) ; aceste studii au fost considerate ca fiind dintre cele mai importante aplicaţii recente ale radioizotopilor. Tot datorită parcursului redus, compuşii cu mare activitate specifică şi tropism pentru celulele maligne sînt promiţătoare arme de luptă contra cancerului, un domeniu foarte actual de cercetare ; s-a experimentat cu unele rezultate 2-metil-1,4-naftochinol-difosfatul tritiat (Synkavit) cu 4 atomi de ^{3}H, de înaltă activitate specifică [569].

În studii biologice tritiul a fost de obicei folosit pentru marcări intrinseci ale unor compuşi organici în scopul studierii metabolismului şi catabolismului lor. În aceste studii, tritiul foloseşte de fapt pentru marcarea atomului de care este legat (de obicei, atomului de carbon), nu ca un agent de marcare pentru hidrogen. De această problemă este legată întrebarea :

De ce să nu se marcheze direct atomul de carbon cu ^{11}C sau ^{14}C ?. Răspunsul trebuie să considere separat aceşti izotopi.

Carbonul-11 deocamdată nu intră în discuţie din cauză că timpul lui scurt de înjumătăţire nu permite sinteze laborioase, costul lui este enorm, iar disponibilitatea este redusă fiind legată de un accelerator.

Scanned with OKEN Scanner

Avantajele marcării cu tritiu în locul carbonului-14 sînt următoarele :

— din cauza energiei radiației β emise de tritiu, de zece ori mai mică decît a radiației β emise de ^{14}C, toxicitatea tritiului este mai mică și efectele radiațiilor sînt mai reduse ;

— deși, din punctul de vedere al timpului de rezidență în organism, ^{14}C și ^{3}H sînt asemănători (timpul biologic de înjumătățire este în ambele cazuri mult inferior perioadei de dezintegrare radioactivă : $T_{biol} = 8-12$ zile la tritiu), faptul că tritiul se dezintegrează cu o probabilitate de aproape 500 de ori mai mare decît ^{14}C face ca activitățile specifice molare ce se pot obține pentru compușii marcați cu tritiu să fie de aproape 500 de ori mai mari decît la ^{14}C. Ținînd seama de faptul că se pot înlocui mai mulți atomi de hidrogen decît de carbon din molecule, și de faptul că masa atomică a tritiului este mai mică decît a carbonului, activitățile raportate la masa de substanță cresc cu încă un ordin de mărime la compușii tritiați față de cei marcați cu ^{14}C ;

— din motivul precedent, cantitățile decelabile de substanță trasoare tritiată sînt atît de mici încît nu perturbă metabolismul normal, chiar la compușii care au o concentrație fiziologică foarte redusă.

Pe de altă parte, însă, în marcările cu tritiu pentru studierea metabolismului, trebuie ținut seama de faptul că marcajul nu este întotdeauna stabil, chiar la legăturile carbon-hidrogen : unele reacții enzimatice duc la schimbul izotopic în anumite poziții sau migrarea în alte poziții. Așa-numita „transpoziție N.I.H."* descoperită de Witkop, Daly și Udenfriend [570—572] este tocmai o neașteptată migrare a hidrogenului legat de nucleele aromatice, de ex. de fenilalanină, din *para* în *meta*, prin intermediul unui epoxid, izomer de valență cu o oxepină [573].

Din acest punct de vedere, marcarea la carbon este lipsită de asemenea primejdii ; de aceea, la marcările cu tritiu se impune controlul integrității marcării folosind alți nuclizi, cum este ^{14}C (tot marcaj intrinsec) sau, mai puțin bine, radionuclizi pentru marcaj extrinsec.

Metabolismul nucleozidelor a fost amplu studiat folosind timidina tritiată [564] : pe lîngă apă tritiată și ADN tritiat, rezultă acid β-aminoizobutiric [574]. Proteinele marcate cu tritiu arată un timp biologic de înjumătățire diferit de al celor marcate extrinsec cu ^{131}I [575], ceea ce se datorează probabil denaturării sau racemizării parțiale la tritiere, nu faptului că iodurarea ar introduce și ea modificări, căci proteinele marcate cu carbon-14 se comportă similar cu cele iodurate (*in vivo*, în iepure) [576].

Deoarece industriei farmaceutice actuale i se cer studii aprofundate de metabolism, distribuție, localizare și excreție, înainte de lansarea unui nou medicament, și întrucît marcarea radioactivă este cea mai eficientă metodă pentru acest scop, astăzi această marcare radioactivă a medicamentelor a căpătat o amploare deosebită pentru asemenea studii. Ca un efect suplimentar, cunoscînd în detaliu farmacocinetica, se pot concepe noi medicamente, mai eficiente. Compușii marcați cu ^{14}C, ^{11}C și ^{3}H au mari perspective în cercetarea farmacologică, așa cum arăta în 1964 prof. Paoletti [577]. Adrenalina, noradrenalina, acidul folic, tristearatul glicerinei și glicerina, metotrexatul, acidul acetic, timidina, sînt numai cîțiva compuși tritiați al căror metabolism a fost studiat în organismul uman ; mulți alți compuși au fost studiați pe animal [542].

---

* N.I.H. este prescurtarea pentru National Institutes of Health, din Bethesda, Maryland, S.U.A.

Scanned with OKEN Scanner

Precizarea căilor biosintetice nici nu ar putea fi concepută fără marcajul radioactiv. Aceasta este însă o problemă care depăşeşte cadrul discuţiei de faţă; se vor menţiona doar cîteva grupe mari de reacţii: biosinteza alcaloizilor, de ex. biosinteza morfinei şi altor alcaloizi benzilizochinolinici; biosinteza izoprenoidelor (terpeni, steroide, vitamina A etc.) legată de încorporarea resturilor de acetat; biosinteza unor antibiotice, de ex. a penicilinei formînd scheletul tiazolidin-β-lactamic prin legarea unui rest de valină cu unul de cistină, au fost toate clarificate cu ajutorul marcărilor fie cu ^{14}C, fie cu ^{3}H, fie cu amîndoi radioizotopii (dublă marcare) [578].

4.10.2. COMPUŞI MARCAŢI CU TRITIU: AVANTAJE ŞI DEZAVANTAJE

Definind compuşii organici drept hidrocarburi şi derivaţi ai hidrocarburilor, reiese că elementul hidrogen se situează pe locul al doilea după carbon în ierarhia importanţei sale în chimia organică. De aceea, compuşii tritiaţi au o mare importanţă potenţială.

Tritiul (^{3}H sau ^{3}T sau T) este singurul radioizotop util al hidrogenului.

Calităţile tritiului (faţă de alţi radionuclizi ai altor elemente) sînt următoarele:

— ^{3}H este cel mai ieftin radioizotop, fiind preparat în cantităţi mari pentru scopuri militare (bombe termonucleare) şi pentru cercetări privind eliberarea controlată a energiei de fuziune;

— ^{3}H este prezent în atmosferă şi în hidrosferă datorită acţiunii radiaţiei cosmice asupra azotului din aer, prin reacţiile nucleare: $^{14}N(n, t)^{12}C$, $^{14}N(p, X)^{3}T$ şi asupra deuteriului din apă prin reacţia: $^{2}H(d, p)^{3}T$.

În ultimele două decenii, pe lîngă cele aprox. 900 g (ca. 9 MCi) de concentraţie staţionară a tritiului pe pămînt s-au format cantităţi mult mai mari de tritiu prin funcţionarea reactoarelor nucleare şi a exploziilor nucleare. Tritiul este un produs normal al funcţionării reactoarelor moderate cu apă grea;

— ^{3}H se poate produce fără purtător în reactoare nucleare prin iradierea cu neutroni a litiului-6 (7,5% din litiul natural), cu sau fără îmbogăţire prealabilă;

— activitatea specifică a tritiului gazos T_2 astfel obţinut este apropiată de cea maximă teoretică (58 kCi/mol); pentru a nu-l manipula ca gaz în vase de presiune, el poate fi absorbit în metale fin divizate (uraniu piroforic). Activitatea specifică a apei tritiate, altă formă convenabilă de manipulare a tritiului ca materie primă, nu poate fi însă atît de ridicată, din cauza autoradiolizei;

— timpul de înjumătăţire de 12,3 ani este suficient de lung ca să se poată efectua cele mai variate sinteze, iar produşii (cu activitate specifică redusă) să poată fi păstraţi sau transportaţi oriunde, dar în acelaşi timp suficient de scurt ca să poată duce la o activitate specifică relativ mare de max. 29 kCi/atom-gram de tritiu şi ca toată această activitate să fie utilizabilă (spre deosebire de ^{14}C, unde numai o mică parte din radioactivitate poate fi utilizabilă în decursul unei vieţi omeneşti);

— radioactivitatea este de tip β^- pur, iar produsul de dezintegrare este izotopul stabil ^{3}He, electronii emişi avînd una din cele mai joase energii

Scanned with OKEN Scanner

dintre toţi radioizotopii cunoscuţi. Energia maximă este de 18,5 keV iar energia medie este de 5700 eV. Un milicurie de tritiu emite o energie de $1{,}82 \times 10^{16}$ eV/zi sau de $7{,}6 \cdot 10^{14}$ eV/oră. În consecinţă, manipularea tritiului nu pune probleme dificile de radioprotecţie căci iradierea externă este minimă (contează doar radiaţia X de frînare la activităţi mari, dar şi această radiaţie are penetrabilitate mică), dat fiind că parcursul maxim al electronilor emişi de tritiu este de 6 mm în aer (0,5 mm parcurs mediu în aer) şi 6 μm într-un material de densitate 1 (apă, ţesut biologic). De aceea, iradierea externă cu tritiu este neglijabilă, căci stratul cornos al epidermei este de grosime suficientă ca să reţină radiaţiile β ;

— datorită acestui fapt, parcursul în emulsia fotografică este doar de 1 μm, ceea ce face ca tritiul să fie radioizotopul ideal pentru autoradiografia de înaltă rezoluţie (de ex. microhisto-autoradiografia) [566].

Dezavantajele tritiului faţă de alţi radioizotopi sînt următoarele :

— datorită radiaţiei β foarte moi, el nu poate fi detectat cu contori cu fereastră ori cristale scintilatoare, ci doar cu scintilatori lichizi, contori cu umplere şi camere de ionizare, de aceea el nu poate fi folosit pentru vizualizare *in vivo* ;

— timpul de înjumătăţire radioactivă este mult mai mare decît timpul de înjumătăţire biologică : pentru apă tritiată în organismul omenesc, acesta din urmă este de 8 —14 zile, luîndu-se valoarea de 8 —12 zile ca medie în climă temperată (în condiţii tropicale, $T_{1/2\ biol.}$ este mai scurt, de 7 zile) ;

— în multe cazuri, marcajul este labil (fie chimiceşte, fie prin metabolism).

4.10.3. OBŢINEREA COMPUŞILOR MARCAŢI CU TRITIU

Dat fiind că tritiul este mai ieftin decît toţi ceilalţi radioizotopi pentru activităţi comparabile, problema randamentului cît mai ridicat nu este atît de critică, cum este de pildă la ^{14}C.

Din cauza activităţii β moi nu sînt necesare instalaţii costisitoare de protecţie cum este cazul la lucrul cu ^{131}I sau ^{32}P. Trebuie ţinut seama de faptul că, în majoritatea cazurilor, se doreşte marcarea stabilă prin formarea unei legături carbon-tritiu, şi îndepărtarea oricărei tritieri labile formate în acest timp la legăturile OH, NH, SH.

În lucrul cu tritiu în fază gazoasă se folosesc activităţi totale mari (pînă la sute de Ci, în laboratoarele specializate), iar la lucrul în soluţie se întreprind sinteze sau schimburi izotopice cu activităţi totale de ordinul unui curie.

Toate cele patru căi generale pentru încorporarea radioizotopilor în molecule pot fi folosite pentru obţinerea compuşilor marcaţi cu tritiu. Ele vor fi discutate în ordinea următoare : schimb izotopic, sinteză chimică, metode biochimice, marcarea radiochimică prin recul.

4.10.3.1. **Schimbul izotopic.** Aceasta este metoda cea mai des folosită, cea mai generală şi cea mai importantă dintre toate metodele de tritiere. La rîndul ei această metodă are două variante : tritierea în atmosferă de tritiu gazos (metoda Wilzbach), sau în soluţie.

Tritierea prin metoda Wilzbach. Această metodă a fost descoperită în 1956 [579, 580] şi reprezintă un fenomen unic în chimie, al cărui mecanism este încă imperfect clarificat. În forma cea mai simplă, ea constă în expunerea

compusului de tritiat, în stare lichidă, în soluţie, sau în stare de pulbere fin divizată, într-o atmosferă de tritiu gazos de mare activitate specifică, timp de cîteva zile ori săptămîni. Apoi excesul de tritiu gazos se evacuează pentru a fi reutilizat, iar compusul tritiat se purifică pentru a îndepărta atît produşii de radioliză cît şi tritierea labilă.

Prin simplitatea şi generalitatea ei, metoda pare foarte atrăgătoare, cu atît mai mult cu cît permite tritierea unor substanţe oricît de complicate. Totuşi, analiza critică a arătat că în multe cazuri impurificarea prin radioliză împiedică obţinerea purităţilor radiochimice necesare în studiile biomedicale.

Aceste dezavantaje fac ca tritierea Wilzbach să fie folosită în caz că nu există alte metode disponibile, sau în caz că se doreşte o substanţă tritiată cu activităţi specifice joase ori medii, cu structură complicată.

Alte moduri de activare pentru tritiere (metoda Wilzbach modificată). Prin folosirea altor moduri de activare, se poate mări eficienţa încorporării tritiului: în metoda Wilzbach iniţială se încorporează circa 1% din activitatea totală a tritiului gazos pe zi. Dacă se foloseşte o activare chimică, electrică sau fotochimică suplimentară a tritiului gazos, se poate mări de 10—100 de ori viteza de încorporare a tritiului, obţinînd activităţi specifice mult mai mari. Uneori, această activare permite obţinerea unor activităţi comparabile cu cele ale tritierii Wilzbach nemodificate, dar în timp mult mai scurt şi cu descompunere mai redusă; alteori se obţin activităţi specifice mult mai mari, într-un timp dat. Din păcate, în unele cazuri activarea accelerează şi formarea produşilor secundari prin favorizarea descompunerilor.

S-au folosit activări ale tritiului gazos prin iradiere cu lumină ultravioletă, cu radiaţii X sau γ, cu ultrasunete ori cu microunde; s-au utilizat descărcări electrice silenţioase, ori folosirea unui filament încălzit în atmosfera de tritiu pentru a-l disocia în atomi liberi.

Mai interesante sînt activările chimice prin folosirea unor catalizatori omogeni (vapori de iod) sau eterogeni. Dintre aceştia din urmă cei mai utilizaţi au fost cărbunele activ şi platina. Prin adsorbţia substratelor organice pe cărbune activ se măreşte mult aria de contact între tritiu şi substrat, ridicîndu-se activităţile specifice cu factori 5—100. În anumite cazuri, de ex. la proteine [581] care pe lîngă ruperi, pot suferi denaturări, este avantajos ca tritierea în prezenţa cărbunelui activ să fie efectuată la temperatura azotului lichid (—196°C) [582]. Prin folosirea unui amestec intim de substrat pulverizat şi platină fin divizată, s-au obţinut datorită efectului de catalizator (şi activator prin disocierea tritiului adsorbit la suprafaţa metalului) creşteri ale activităţii specifice de 10—2000 ori. S-au observat creşterile cele mai mari la compuşii aromatici. La temperaturi ceva mai ridicate (60°C) se pot folosi şi alţi catalizatori de hidrogenare, cum este nichelul Raney, pentru tritierea hidrocarburilor volatile. În fine, s-au folosit şi amestecuri de cărbune activ cu platina, pentru a realiza o activare suficientă ca să se poată tritia substrate sensibile, cum sînt unele steroide care altfel dau doar reacţii secundare.

În tritierea Wilzbach sau Wilzbach modificată prin activare, se pot substitui toţi atomii de hidrogen ai substratului prin tritiu. În practică, nu se obţine totuşi o marcare uniformă (U) ci, deobicei, o marcare generală (G) căci unele poziţii se tritiază mai rapid decît altele (regiospecificitate).

Scanned with OKEN Scanner

Schimbul izotopic în soluţie. Schimbul izotopic în soluţie poate duce, de obicei, la activităţi specifice mai ridicate decît tritierea Wilzbach, deşi solvenţii folosiţi au o activitate specifică iniţială mai redusă decît tritiul gazos. Acest fapt se explică prin eficienţa mai mare de încorporare a tritiului din solvent decît din gaz.

Schimbul izotopic în poziţii labile (alcooli, acizi carboxilici, fenoli, amine primare sau secundare, tioalcooli şi tiofenoli în HTO) are loc instantaneu. În anumite cazuri, are loc relativ rapid şi schimbul la carbon, de ex. la dizolvarea în HTO a acidului malonic, se produce cu viteză măsurabilă legarea tritiului de carbon. Prin decarboxilare se obţine acid acetic tritiat, cu marcajul stabil. Aceasta este însă o sinteză chimică, avînd o primă etapă de schimb izotopic.

Pentru a realiza schimbul izotopic în soluţie în poziţii stabile (legături C—H → C—T), este necesară folosirea catalizatorilor omogeni ori eterogeni.

Catalizatorii omogeni acizi pot fi folosiţi pentru a tritia la nucleu compuşii aromatici benzenoizi sau heterociclici, prin substituţie electrofilă. S-au folosit următorii catalizatori în HTO : acizii sulfuric [583], fosforic [584], percloric [585], sau trifluoracetic [586]. Toţi aceşti acizi sînt tari şi permit tritierea compuşilor activaţi cu grupe donoare de electroni sau a hidrocarburilor aromatice.

Pentru a nu produce sulfonări la folosirea H_2SO_4, trebuie evitate temperaturile ridicate. Pentru compuşii dezactivaţi cu grupe acceptoare de electroni, sînt necesari acizi şi mai tari ; s-au descris doi asemenea acizi complecşi : Constanţa Măntescu şi A. T. Balaban [587, 588] au folosit apă tritiată plus clorura de aluminiu care formează acidul Brönsted $T^+[AlCl_3OH]^-$; P.M. Yavorsky şi E. Gorin [584] au utilizat acidul fosforic tritiat plus florura de bor, care formează acidul complex $T^+[H_2PO_4BF_3]^-$. Cu $T^+[AlCl_3OH]^-$ s-au tritiat benzen, clorbenzen, nitrobenzen, fluorbenzen şi derivaţi de piridină, obţinîndu-se reacţii rapide, cu manoperă redusă.

Într-o serie de alte cazuri, în locul folosirii catalizatorilor acizi se recomandă catalizatori bazici, de ex. atunci cînd există grupe cetonice (cum este cazul la steroide) sau carboxilice. Are loc schimbul izotopic al hidrogenilor din poziţiile învecinate carbonului [589].

În cazul cînd nu există asemenea grupe activatoare, trebuie folosite baze foarte tari în solvenţi adecvaţi (amidură de sodiu în amoniac lichid, alcoxizi în dimetilformamidă sau în dimetilsulfoxid) [590].

Recent s-a încercat folosirea catalizatorilor omogeni cu metale tranziţionale, de ex. cloroplatinat de potasiu [591], dar rezultatele nu sînt atît de bune ca acelea cu catalizatori eterogeni.

Avantajele acestor metode faţă de tritierile de tip Wilzbach sînt manipulările relativ simple, folosirea unor activităţi reduse care se încorporează cu eficienţă ridicată, evitarea instalaţiilor de vid şi a radiolizei avansate.

Catalizatorii eterogeni au fost folosiţi mai mult decît cei omogeni. Metoda rezidă în încălzirea unui amestec de solvent tritiat (HTO, sau acid acetic tritiat CH_3COOT obţinut prin refluxarea apei tritiate cu anhidridă acetică) cu substratul dizolvat şi cu un catalizator (pulbere de platină ori paladiu, eventual adsorbită pe suport de cărbune ori carbonat de calciu). Garnett a studiat amplu această metodă [592—594] aplicînd-o la diferite clase de compuşi organici : aminoacizi, hidrocarburi aromatice, purine, pirimidine, nucleozide, steroide etc. Faţă de tritierea de tip Wilzbach,

Scanned with OKEN Scanner

metoda este preferabilă căci evită radioliza avansată dat fiind timpul scurt de reacţie (2—24 h), nefiind necesare purificări laborioase, şi duce la activităţi specifice de 100—1000 ori mai mari. Recuperarea şi refolosirea solventului tritiat este uşoară, nu sînt necesare instalaţii complicate.

4.10.3.2. **Sinteza chimică.** Pentru a obţine marcări în poziţii specifice şi pentru a obţine activităţi specifice ridicate, metoda preferată este sinteza chimică. Materia primă este fie tritiul gazos care poate fi obţinut fără purtător, cu activitatea specifică maximă de 58 kCi/mol T_2 (abundenţă izotopică 100%), fie apa tritiată care se foloseşte la abundenţe izotopice de ordinul unui procent (0,29 mCi/mol HTO) din cauza radiolizei. În adevăr, oxidul de tritiu pur T_2O, cu abundenţa izotopică 100%, ar avea o activitate de 2640 Ci/g; această apă tritiată fără purtător este luminescentă şi emite o energie de $6 \cdot 10^{17}$ eV/ml.s, ceea ce ar duce la o doză de iradiere de 10 miliarde rad/zi, provocînd atît autoradioliza avansată a moleculelor de T_2O, cît şi radioliza rapidă a oricărui substrat dizolvat. De aceea, formula practică a apei tritiate este HTO, nu T_2O. Apa tritiată de activitate specifică ridicată se obţine prin oxidarea tritiului gazos folosind catalizator de paladiu, sau folosind ca reactant oxidul cupric [595]. Pentru prepararea apei tritiate cu abundenţe izotopice de 1% sau mai mici, este preferabil schimbul izotopic între T_2 şi H_2O în prezenţa platinei; în condiţii slab acide se atinge echilibrul destul de rapid, astfel că punînd în contact un mol T_2 cu 100 moli H_2O, rămîne în fază gazoasă doar 1% din activitate [596].

Există două reacţii de bază în sinteze, care pot fi adaptate celor mai variate substrate:

a) adiţia T_2 sau T^- la legături multiple,

b) substituţia halogenilor prin tritiu.

Adiţia tritiului (T_2) *la legături multiple* $C=C$, $C=O$, $C\equiv C$ *sau* $C\equiv N$ este reacţia care duce la cele mai ridicate activităţi specifice căci se pot adiţiona 1 — 4 atomi de tritiu cu activitate specifică maximă. Condiţiile de reacţie sînt blînde, preferîndu-se folosirea catalizatorilor foarte activi (Pt, Rh, Pd) care nu necesită presiune, în solvenţi nepolari: hidrocarburi (benzen, ciclohexan), eteri (dioxan, tetrahidrofuran), esteri (acetat de etil), dimetilsulfoxid.

Adiţia tritiurilor metalice la legături multiple $C=O$, $C\equiv N$. Asemenea legături polarizate din aldehide, cetone, esteri, acizi şi nitrili pot adiţiona tritiul din anioni $Na^+BT_4^-$ sau $Li^+AlT_4^-$, ducînd la compuşi ce conţin tritiul legat specific:

$$R_2CO \longrightarrow R_2CT-OH$$

Constanţa Măntescu şi colab. au pus la punct pentru prima dată în ţara noastră metode pentru obţinerea tritiurilor metalice şi pentru prepararea steroidelor tritiate plecînd de la aceste tritiuri.

Substituţia halogenilor prin tritiu. Reacţia de substituţie a halogenilor cu tritiu gazos are ecuaţia:

$$RHal + T_2 \longrightarrow R-T + HalT$$

În prezenţă de catalizator (Pt, Pd, Pt/C, Pd/C, $Pd/CaCO_3$, nichel Raney), toţi halogenii pot fi înlocuiţi cu tritiu în condiţii blînde. Se folosesc solvenţi polari ori nepolari, în prezenţă de baze pentru neutralizarea hidracizilor rezultaţi. Reacţia se aplică cu succes cînd există disponibili

Scanned with OKEN Scanner

compuşi halogenaţi sau cînd ei se pot prepara uşor, ca în cazul compuşilor aromatici, purinelor sau pirimidinelor. Marcarea este specifică, cu tritiul în locul halogenului [542]. Cristina Bratu a descris o variantă electrochimică a acestei metode, care foloseşte apa tritiată drept solvent evitînd atmosfera de tritiu gazos, pentru tritierea pirimidinelor [597].

4.10.3.3. **Metode biochimice.** Obţinerea compuşilor tritiaţi prin metode biochimice are o importanţă relativă mai redusă decît metodele precedente de preparare a compuşilor marcaţi cu tritiu.

Dacă în cazul obţinerii compuşilor marcaţi cu carbon-14, metodele biochimice ocupă un loc important, în cazul compuşilor tritiaţi se recurge la metode biochimice numai în cazuri cu totul speciale, cum ar fi cele în care trebuie obţinuţi enantiomeri puri ai unor compuşi cu structură relativ complicată.

4.10.3.4. **Marcarea radiochimică prin recul.** Principiul metodei constă în folosirea energiei de recul a două reacţii nucleare produse în reactor sub acţiunea neutronilor lenţi :

în fază condensată : $^{6}Li\ (n, \alpha)^{3}H$,

în fază gazoasă : $^{3}He\ (n, p)^{3}H$.

Atomii de tritiu preiau o energie cinetică mult mai mare decît energiile legăturilor chimice, de aceea ei sînt proiectaţi la distanţe relativ mari de locul lor de generare, îşi pierd repede energia prin coliziuni şi, cînd rămîn cu energii de ordinul zecilor de electron-volţi, dau „reacţii de atomi fierbinţi" (substituţii, adiţii) [598, 599].

Din păcate, există două limitări principale care fac ca această metodă să fie astăzi practic părăsită :

— datorită iradierii gamma şi neutronice în reactor, precum şi radierii cu produşii reacţiei nucleare (particule α, protoni, tritoni reculaţi) radioliza este extrem de avansată ;

— limitînd iradierile la nivelul maxim acceptabil, activităţile specifice ce se pot atinge sînt infime (de ordinul a 1 mCi/gram).

Timpul optim de iradiere la reactor este de 10 —20 ore.

În concluzie, dintre toate metodele descrise, se preferă sinteza chimică pentru tritierea moleculelor simple la activităţi specifice mari, ori schimbul izotopic atunci cînd el este posibil. Pentru obţinerea unor molecule complicate tritiate se recurge uneori la metoda Wilzbach, în special în variante activate, iar pentru realizarea unor sinteze stereospecifice de compuşi biologic activi plecînd de la substanţe simple tritiate sintetic, se folosesc uneori metode biochimice.

BIBLIOGRAFIE

1. N. Bartlett, *Proc. Chem. Soc.*, **1962**, 218.
2. S.I. Morrow, A.R.H. Young, *Inorg. Chem.*, **3**, 759 (1964).
3. R.D. Peacock, H. Selig, I. Sheft, *Proc. Chem. Soc.*, 285 (1964).
4. I. Sheft, T.M. Spitler, F.H. Martin, *Science*, **145**, 701 (1964).
5. G.L. Gard, G.H. Cady, *Inorg. Chem.*, **3**, 1745 (1964).
6. J.H. Burns, R.D. Ellison, H.A. Levy, *Acta Cryst.*, **18**, 11 (1965).
7. G.J. Perlow, M.R. Perlow, *J. Chem. Phys.*, **41**, 1157 (1964).
8. E.H. Appelman, M. Anbar, *Inorg. Chem.*, **4**, 1066 (1965).
9. J.G. Malm et al., *Chem. Revs.*, **65**, 199 (1965).
10. M.W. Haseltine, H.C. Moser, *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 2497 (1967).

Scanned with OKEN Scanner

11. A.N. Murin et al., *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **161**, 611, (1965); a. A.N. Murin et al., *Radiokhimya*, **7**, 620 (1966).
12. A.N. Murin et al., *Radiokhimiya*, **8**, 449 (1966).
13. E. Schumacher, M. Schaefer, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 150 (1964).
14. Y. Marcus, D. Cohen, *Inorg. Chem.*, **5**, 1740 (1966).
15. V.D. Nefedov et al., *Radiokhimiya*, **9**, 138 (1967).
16. C.L. Chedrick, U.S. Atomic Energy Commission, *The Chemistry of The Noble Gases*, Division of Technical Information, Oak Ridge, Tennessee, 1967.
17. F.A. Cotton, G. Wilkinson F.R.S., „Advanced Inorganic Chemistry", Interscience, John Wiley, New York, 1967.
18. M.S. Ahmetov, „Neorganiceskaya khimiya", Vyshaya shkola, Moskva, 1975.
19. I.S. Kirin, Iu. K. Gusev et al., „Polucenie mecenyh soedinenii Ksenona, Sbornik trudov, Minsk, 1968; Gosatomizdat, Moskva, 1973.
20. R. Starke, E. Gunter, *Radiochim. Acta*, **2, B**, 159 (1964).
21. R. Margraff, J. Adloff, *Radiochim. Acta*, **6**, 138 (1966).
22. G.J. Perlow, M.R. Perlow, *J. Chem. Phys.*, **41**, 1157 (1964).
23. G.J. Perlow, M.R. Perlow, *Rev. Med. Phys.*, **361**, 353 (1964).
24. V.M. Zaitsev et al., Tezisy dokladov Vsesoiuznogo sovesciania „Soedineniya inertnyh gazov", Moskva, 1968.
25. M. Tubis, E. Posnick, R.A. Nordyke, *Proc. Soc. Exp. Med.*, **103**, 497 (1960).
26. A.E.A. Mitza, A. Fraga, N. Veall, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **12**, 146 (1961).
27. K.E. Scheer, W. Meier-Borst, *Nucl. Med. Stutig.*, **2**, 193 (1961).
28. E. Hallaba, M. Raich, *Atompraxis*, **15**, 330 (1969).
29. G.N.B. de Salas, A.E.A. Mitta, *Radiochem. Acta*, **15**, 92 (1971).
30. C.A. Macropoulos, *Radiochim. Acta*, **8**, 170 (1967).
31. L.J. Anghileri, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **15**, 95 (1964).
32. E.N. Denisov, USSR Patent 171.084, May 11, 1965; *Chem. Abstr.*, **63**, 12637 f (1965).
33. E. Hallaba, M. Raich, N. Missak, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **20**, 865 (1969).
34. D.W. Brown, N.J. Phelps, D.L. Palmer, *J. Nucl. Med.*, **6**, 287 (1965).
35. J. Burianek, J. Cifka, Collection of works of State Institute for Control of Drugs (Prague), 130 (1970).
36. Radioactive Pharmaceuticals, Proc. Symp. Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Nov. 1—4, 1965; Editors G.B. Anreus, R.M. Kniselly, H.N. Wagner Jr., USAEC Oak Ridge, 1966.
37. G. Magnusson, *Nature*, **195**, 591 (1962).
38. L. Varga, I. Kelemen, A. Kovach, *J. Nucl. Med.*, **9**, 604 (1968).
39. T.A. Hosick, F.C. Watts, I. Meschan, *J. Nucl. Med.*, **7**, 643 (1966).
40. H. Herzmann, H.G. Seindenglanz, L. Bölke, *Isotopenpraxis*, **3**, 418 (1967).
41. G.I. Gleason, *J. Biol. Chem.*, **213**, 837 (1955).
42. L.J. Anghileri, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **14**, 328 (1963).
43. A. Höye, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 695 (1968).
44. A.D. Williams, D.E. Freeman, W.H. Florsheim, *J. Chromatography*, **45**, 371 (1969).
45. D. Gehring, *J. Nucl. Med.*, **8**, 306 (1969).
46. J.R. Tata, *Clin. Chim. Acta*, **4**, 427 (1959).
47. G.B. Cook, I. Gălăţeanu, Radiochemical Conference Bratislava, Czechoslovakia, September 6—10, 1966.
48. Y. Cohen, J. Bralet, P. Frapart, 2nd Intern. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds, Brussels, Nov. 28 — Dec. 3, 1966— Euratom Brussels, Belgium (published 1968).
49. A. Van Zyl, *Clin. Chim. Acta*, **7**, 20 (1962).
50. G.B. Cook, I. Gălăţeanu, 2nd Intern. Conf. on Method of preparing and Storing Labelled Compounds; Euratom Brussels Belgium, Nov. 28—Dec. 3, 1966 (published 1968).
51. I. Gălăţeanu, G.B. Cook, Proc, IAEA Panel on „Analytical Control of Radiopharmaceuticale", Vienna, 7—11 July 1969; IAEA, Vienna, 1970.
52. H. Schom., C. Winkler, *J. Chromatog.*, **18**, 69 (1965).
53. J.G. Heider, J. R. Bronk, *Biochim., Biophys, Acta*, **95**, 353 (1965).
54. Y. Cohen, Radioactive Pharmaceuticals, Proc. Symp. Oak Ridge, USAEC Oak Ridge, 67, 1966.
55. N.G.S. Gopal, V.K. Iya, *J. Sci. Ind. Res.*, **26**, 153 (1967).
56. N.G.S. Gopal, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **17**, 75 (1966).
57. W.S. Reith, W. Tampion, Nature, 197, 180 (1963). Proc. Conf. in Methods of Preparing and storing Labelled Molecules, Brussels Nov. 13—16, 1963. EUR — 1625 e.
58. A.E.A. Mitta, G.B. de Salas, Report CNEA—235 Buenos Aires, Argentina, 1968.
59. E. Hallaba, H. El-Asrag, Y. Abou Zeid, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **21**, 107 (1970).

Scanned with OKEN Scanner

588. C. MĂNTESCU, A. GENUNCHE, A.T. BALABAN, *J. Labelled Comp.*, **1**, 178 (1965); **2**, 261, 267 (1966).
589. P.D. KLEIN, R. LESTER, în „Proc. 2nd Internat. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds", Euratom, Brussels, 1968, p. 353, editor J. SARCHIS.
590. A.I. ŞATENŞTEIN, „Izotopnii obmen i zameşcenie vodoroda v organiceskih soedineniah", Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskva, 1960 (sau traducerea în germană).
591. J.L. GARNETT, R.J. HODGES, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4546 (1967). J.L. GARNETT, în acelaşi volum ca ref. 589, p. 709.
592. M. A. LONG, J. L. GARNETT et al., *J. Chem Soc. Perkin* II, **1975**, 1298; *Tetrahedron Letters*, **1978**, 4171.
593. C.M. FERNANDEZ, J.L. GARNETT, *J. Labelled Comp.*, **3**, 155 (1967).
594. J.L. GARNETT et al., în „Proc. Symp. Tritium in the Physical and Biological Sciences", IAEA, Vienna, 1962, vol. 2, p. 47.
595. E.J. WILSON, *Vacuum*, **4**, 303 (1954).
596. C.G. SWAIN, A.J. KRESGE, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5281 (1958).
597. C. BRATU, *J. Labelled Comp.*, **7**, 161 (1971).
598. P.L. WOLFGANG, S.F. ROWLAND, C.N. TURTON, *Science*, **121**, 715 (1955).
599. A.P. WOLF, în „Advances in Physical Organic Chemistry", vol. 2, p. 201, 1964, editor V. GOLD, Academic Press, New York.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

TRECEREA DE LA COMPUȘI MARCAȚI LA COMPUȘI RADIOFARMACEUTICI

Încă din antichitate se cunosc efectele terapeutice sau toxice ale unor plante. Pe parcursul veacurilor omul a căutat să se folosească de aceste plante, fie în formă simplă de ceaiuri fie reușind să le prelucreze în scopul extracției din ele a principiilor active, să le concentreze și să le utilizeze sub formă de substanțe medicamentoase. Principiile active din plante nu sînt altceva decît substanțe chimice singulare sau grupe ale acestora, acționînd asupra organismului omului și al animalelor funcție de structura chimică și proprietățile lor fizico-chimice. Cu timpul, omul a căutat să stabilească o serie de relații între structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale multor substanțe chimice pe de o parte și activitatea lor biologică (acțiunea lor asupra organismului) pe de altă parte. Pornind de la ipoteza că *acolo unde există o asemănare de structură chimică a anumitor compuși chimici există și o activitate biologică asemănătoare*, s-a reușit să se obțină pe cale de sinteză o serie de compuși chimici care posedau proprietăți fizico-chimice și activități biologice de valori apropiate. În acest fel s-au obținut medicamentele care după cum se știe, după definiția OMS [1] sînt substanțe (compuși) chimice sau amestecuri ale acestora, fabricate, puse în vînzare sau prezentate pentru a fi folosite la :

— tratamentul, atenuarea, prevenirea ori diagnosticul unor boli, unor stări fizice anormale sau a simptomelor acestora la om ori animal,

— restaurarea, corectarea sau modificarea funcțiilor organice la om sau la animal.

Medicamentele trebuie să se supună unor norme stricte din punctul de vedere al purității chimice, sterilității, netoxicității, apirogenității etc., fiind supuse unui control de calitate atît sub aspect fizico-chimic cît și biologic și farmacodinamic.

În ceea ce privește radiofarmaceuticele, acestea trebuie să îndeplinească în plus unele criterii severe de puritate radionuclidică și radiochimică. Astfel, un produs radiofarmaceutic se poate defini ca fiind un compus marcat radioactiv care îndeplinește caracteristicile unui medicament și care este destinat de a fi introdus în organismul uman în scopuri terapeutice sau de diagnostic. Pentru ca un compus chimic (medicament) să devină un produs radiofarmaceutic, acesta se supune marcării cu un anumit radionuclid ale cărui caracteristici nucleare corespund scopului propus de utilizare în medicina nucleară. Marcajul unui compus chimic (medicament) cu atomi radioactivi poate fi făcut așa cum se arată mai detaliat în capitolul 3, în două moduri principial diferite ; marcaj „intrinsec", în care radionuclidul (de ex. tritiul sau iodul -131) substituie un atom stabil al aceluiași element (de ex. hidrogen) sau iod neradioactiv din hormonii tiroidieni, și

marcaj „extrinsec", în care radionuclidul (de ex. iod-131) substituie un atom stabil al altui element (hidrogen, sau adiţie la dubla legătură C = C) (sau techneţiu-99m). Numai primul mod de marcaj lasă proprietăţile chimice şi biologice nemodificate.

5.1. CRITERII DE ALEGERE A RADIONUCLIZILOR PENTRU ÎNCORPORAREA LOR ÎN RADIOFARMACEUTICE

Utilizarea largă, într-un ritm accelerat, a radiofarmaceuticelor în medicina nucleară pentru diagnostic şi terapie a impus rezolvarea unor probleme diferite pentru producător şi beneficiar, pe de o parte, şi pentru furnizorii de aparatură medicală, pe de altă parte. În funcţie de scopul medical pentru care este utilizat un produs radiofarmaceutic, se face alegerea radionuclidului respectiv şi a formei chimice a acestuia, în care produsul respectiv poate fi utilizat cu eficienţă maximă. De aceea, în selectarea unui radionuclid pentru diagnostic şi terapie trebuie să se ţină seamă de următoarele considerente:

1) radionuclidul trebuie să aibă caracteristici nucleare optime, îndeosebi energia radiaţiei gamma să fie astfel încît să permită obţinerea unei imagini scintigrafice cît mai bune;

2) radionuclidul respectiv trebuie să posede astfel de energii ale radiaţiilor sale şi astfel de timp de înjumătăţire încît doza de iradiere internă livrată pacientului după administrare, pe toată durata testului medical, să fie cît mai mică posibil;

3) radionuclidul trebuie să aibă proprietăţi chimice corespunzătoare, astfel încît comportarea lui biologică să răspundă scopului urmărit (localizarea lui numai în organul destinat testării medicale), iar perioada lui de eliminare din organism (timpul de înjumătăţire biologic) să fie cît mai mică posibil. De aceea el trebuie să aibă o afinitate selectivă faţă de anumite organe sau grupuri de organe, iar în anumite cazuri specifice să nu fie metabolizat, adică să fie inert din punct de vedere fiziologic şi să nu fie toxic.

Calităţile principale ale unui produs radiofarmaceutic sînt următoarele: să poată fi marcat uşor (procedură simplă), să poată fi obţinut în condiţii normale şi să fie stabil.

În ceea ce priveşte comportamentul biologic al unui produs radiofarmaceutic, marcajul intrinsec este ideal: radioizotopul poate fi astfel ales, încît el să facă parte integrantă din procesul metabolic, fiind deja un produs ce intră în componenţa (structurală sau funcţională) a organului respectiv, şi care să poată fi marcat radioactiv. Astfel de produşi sînt hormonii tiroidieni care iniţial conţin atomi de iod în structura lor chimică şi permit o marcare cu iod radioactiv. La fel, metionina conţine atomi de sulf şi poate fi marcată cu sulf-35 iar cianocobalamina conţine cobalt şi poate fi marcată cu cobalt-60 sau -58 etc. În acest caz, marcarea radioactivă a compusului respectiv nu alterează sau nu diminuează „integrita tea biologică" a acestuia şi ca atare în organism el se comportă identic ca şi compusul marcat.

Însă numărul unor asemenea compuşi radiofarmaceutici este limitat, deoarece majoritatea compuşilor biologici importanţi nu conţin în structura lor chimică elemente ai căror izotopi radioactivi să aibă caracteristici nucleare favorabile aplicaţiilor medicale. De exemplu, aceştia în mare

Scanned with OKEN Scanner

parte conţin atomi de hidrogen, oxigen, azot, carbon, fosfor, dar care fie că au perioade de dezintegrare foarte scurte, fie că energia sau felul radiaţiilor sînt nefavorabile. De aceea, în aceste cazuri se recurge la o marcare radioactivă extrinsecă prin introducerea unui „atom străin" în structura acestor compuşi, ca de exemplu iod-131 sau iod-125 în structura unor proteine sau lipide, ori techneţiu-99m în serumalbumină umană etc. Odată introdus un atom străin în molecula unei substanţe, aceasta îi modifică comportamentul biologic . În acest caz, utilizarea acestor compuşi trebuie să fie dirijată numai spre teste în care compusul respectiv să nu servească ca instrument de studiu al metabolismului, deoarece rezultatele obţinute nu ar fi general valabile. Astfel, din acest motiv, serumalbumina umană marcată cu iod-131, se recomandă a fi utilizată numai în studii ale circulaţiei sîngelui, nu şi ale metabolismului bazal.

Pe de altă parte, un mare număr de compuşi radiofarmaceutici marcaţi extrinsec au un comportament biologic satisfăcător, deoarece au o perioadă biologică relativ scurtă şi nu sînt toxici. Aceste proprietăţi ale radiofarmaceuticelor atît „intrinseci" cît şi „extrinseci" au permis ca utilizarea lor în medicină pentru diagnostic să fie concentrată pe următoarele domenii :

a) studii privind localizarea unui compus într-un anumit organ sau migrarea lui în alt organ funcţie de anumiţi factori patologici şi fiziologici ; astfel de compuşi radiofarmaceutici sînt numeroşi şi în mare parte conţin radioizotopii : ^{131}I, ^{75}Se, ^{99m}Tc, ^{113m}In, ^{203}Hg, ^{198}Au etc. ;

b) studii de determinare a metabolismului unui anumit produs farmaceutic administrat ;

c) studii privind determinarea traseului în organism al unui compus sau izolat într-un organ ;

d) determinarea analitică a unor produse biologice din anumite fluide provenite din diferite organe izolate.

Marea majoritate a radiofarmaceuticelor sînt în prezent utilizate în cadrul primului domeniu de mai sus pentru scintigrafia anumitor organe, iar o parte pentru determinări de compuşi biologici prin metoda radioimunologică, în cadrul ultimului domeniu.

5.2. CARACTERISTICILE ŞI PRODUCEREA RADIOFARMACEUTICELOR

Producerea radiofarmaceuticelor include următoarele probleme :

a) procurarea, prepararea şi controlul materiei prime, inclusiv radioizotopii ;

b) procesarea chimică şi purificarea ;

c) determinări fizico-chimice ale caracteristicilor produsului şi divizarea în porţii diferite ;

d) controlul analitic de calitate conform legislaţiei pentru utilizarea în medicină ;

e) ambalarea şi distribuţia.

Vom trata mai jos, rezumativ, fiecare din aceste probleme.

a) În principal, producătorul de radiofarmaceutice, înainte de a începe producţia, trebuie să posede radioizotopii respectivi, precum şi substanţele şi materia primă neradioactive. Radioizotopii pot fi produşi de însuşi producătorul radiofarmaceuticelor sau pot fi procuraţi din altă parte.

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, înainte de începerea producției este necesar ca o serie de solvenți și substanțe chimice să fie purificate și analizate din punctul de vedere al purității chimice și supuse controlului biologic pentru apirogenitate și netoxicitate.

b) În funcție de posibilitățile existente și de scopul în care este folosit produsul radiofarmaceutic, se face alegerea procesului de producție și de purificare. În orice caz, procesul ales trebuie să fie pe cît posibil simplu, rapid și eficient, astfel încît să se obțină randamente chimice și radiochimice maxime cu pierderi minime de radioactivitate. Printre metodele de separare și purificare des utilizate în procesul de producție menționăm : extracția cu solvenți ; cromatografia pe hîrtie ; cromatografia în strat subțire sau gazoasă ; filtrarea pe coloană cu schimbători de ioni sau cu gel ; precipitarea ; distilarea și volatilizarea ; electroliza etc.

c) După ce produsul radiofarmaceutic a fost obținut și purificat, acesta este supus unor determinări pentru următorii parametri :

— activitatea totală exprimată în curie sau submultipli (mCi, μCi) la o anumită dată ;

— concentrația radioactivă, exprimată în curie sau submultipli într-un mililitru de soluție ;

— activitatea specifică, exprimată în curie sau submultipli într-un gram sau milimol de substanță ;

— concentrația chimică (pentru purtător) și pH-ul.

d) Controlul calității produselor radiofarmaceutice constă în primul rînd în determinarea analitică a purității chimice și radiochimice a acestor produse, respectiv a materiilor prime, și a subproduselor intermediare. În al doilea rînd el constă și în determinarea purității radionuclidice. În afară de acestea, produsul final mai este supus și unui control biologic [2—5].

În ceea ce privește legiferarea administrării de radiofarmaceutice, înainte ca produsul respectiv să fie comercializat, acesta este supus unor încercări pe animale de către unități specializate ale Ministerului Sănătății, respectiv ale Institutului pentru controlul de stat al medicamentului, după care produsul radiofarmaceutic poate fi avizat și inclus în Farmacopeea Națională și în acest caz toate specificațiile și parametrii tehnici ai acestui produs devin condiții obligatorii ce trebuie respectate.

e) Ambalarea și distribuția produselor radiofarmaceutice este asigurată de către producător în conformitate cu prevederile regulamentelor naționale și internaționale. Aceste operații trebuie să se facă astfel încît, în general, să se respecte următoarele :

— ambalarea etanșă și sigură a conținutului radioactiv. În acest scop preparatul radioactiv este introdus și închis într-un conteiner primar (fiole de sticlă, flacoane mici de sticlă sau material plastic), care la rîndul lui se introduce într-un conteiner de protecție (din plumb sau alt material de protecție împotriva radiațiilor) ;

— protecția la iradiere a personalului, care manipulează și transportă astfel de materiale radioactive, și a populației din jur ;

— o economicitate la transport (să nu aibă gabarite mari), fiind ușor de manipulat. Fiecare conteiner trebuie să fie etichetat, în exterior, indicîndu-se substanța radioactivă, activitatea totală, data preparării etc., iar în interiorul conteinerului se introduce un certificat de livrare cuprinzînd toate specificațiile necesare pentru utilizarea produsului radioactiv.

Scanned with OKEN Scanner

În prezent, radiofarmaceuticele care se găsesc în uz, în funcţie de metodele de preparare şi de caracteristicile lor, se pot clasifica astfel [6—8]:

1) Preparate radioactive obţinute prin iradierea ţintelor, urmată de prelucrarea chimică simplă, ca de exemplu dizolvarea lor în acizi sau baze, unii radioizotopi de uz medical primar sub formă de săruri simple cum sînt de ^{24}Na, ^{42}K, $^{55-59}Fe$ etc..

2) Preparate radioactive obţinute printr-o separare chimică a unui radionuclid oarecare din ţinta iradiată. În acest caz procesele chimice folosite sînt: distilarea, oxido-reducerea, depunerea electrochimică, extracţia cu solvenţi, precipitarea şi coprecipitarea. În această grupă de radionuclizi, cei mai des obţinuţi sînt: ^{131}I, ^{125}I, ^{32}P, ^{76}As, ^{51}Cr, ^{64}Cu, ^{35}S, ^{75}Se etc., care, apoi pot fi incluşi într-o serie de compuşi simpli.

3) Compuşii radiofarmaceutici, care sînt preparate radioactive obţinute prin sinteză organică şi anorganică sau printr-o marcare a acestora prin metodele de schimb izotopic, substituţie, complexare, biosinteză, recul, sinteză sub radiaţii şi altele. Din această categorie fac parte un număr foarte mare de compuşi marcaţi cu iod-131, iod-125, seleniu-75, mercur-197 şi -203, cobalt-58 şi -57. Dintre aceşti compuşi amintim compuşii marcaţi cu iod-131 ca: monoiodtirosină, diiodtirosină, triiodtironină, tiroxină, hipuran, hypac, iodantipiridină, renografin, roz-bengal, uracil, uridină, urokon, vasurix, fibrinogen, serum albumina, insulină, acid oleic, trioleină, lipiodol, glomerfil etc., iar dintre compuşii cu alţi radionuclizi menţionăm: selenometionina-^{75}Se, neohidrina-^{203}Hg, bromercuri-hidroxipropan-^{203}Hg, cianocobalamina-^{58}Co etc.

4) Produse radiofarmaceutice obţinute prin marcare cu radionuclizi din generatori. Aceste preparate constau dintr-un radionuclid-fiică cu timp de înjumătăţire scurt care, la rîndul său, se obţine dintr-un radionuclid-părinte cu timp de înjumătăţire lung prin eluţie de pe o coloană cromatografică sau prin extracţie cu solvenţi. Astfel de radiofarmaceutice sînt: pertechnetatul de sodiu-^{99m}Tc, complexul de techneţiu-99m cu acidul ascorbic, complexul de techneţiu-99m cu acidul dietilentetraaminopentaacetic, clorura de indiu-113m şi mulţi alţi compuşi (vezi cap. 4).

5) Coloizi sau particule agregate. În prezent, cîţiva radionuclizi sînt utilizaţi în scop medical în forma unor coloizi şi microagregate, sau macroagregate cu dimensiuni bine definite ale particulelor. Aceştia sînt obţinuţi în principal prin precipitarea unor metale, metaloide sau săruri ale acestora în medii de gelatină sau alte substanţe care formează soluţii coloidale. Astfel de produse radiofarmaceutice sînt: aur-198 coloidal, coloid de techneţiu-99m cu sulfură de stibiu, coloid de ytriu-90, coloid de crom-51 şi fosfor-32, coloid de hidroxid de ceriu-144, sare de luteţiu-177, macroagregate de serumalbumină cu techneţiu-99m, macro- şi microagregate de hidroxid de indiu-113m cu serumalbumină etc.

6) Preparate radioactive folosind radionuclizi de viaţă scurtă preparaţi cu ajutorul acceleratoarelor. Pentru micşorarea dozei la minimum primită de pacienţi, timpul de înjumătăţire ideal al unui radioizotop ar trebui să fie egal cu al duratei examenului scintigrafic. Acest lucru nu se realizează decît cu radioizotopi de viaţă scurtă produşi la ciclotron. Din ce în ce mai mult, în ultimii ani, se folosesc asemenea radioizotopi ($T_{1/2}$ dat în paranteze) ca: ^{18}F (110 min); ^{11}C (20 min); ^{123}I (13 h); ^{13}N (10 min) etc. Încorporarea unor asemenea radioizotopi în substanţe marcate necesită punerea la punct a unor metode rapide de sinteză sau biosinteză [8—14].

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1 International Pharmacopeea, ediția a 2-a și supliment 1971, Organizația Mondială a Sănătății (OMS), Geneva, 1971.

2. I. GĂLĂȚEANU, G.B. COOK, „Self — descomposition of some Iodine-131 labelled Radiopharmaceutical (intercomparison)", Proc. IAEA Panel on Analytical Control of Radiopharmaceuticals, 7—11 July 1969, IAEA, Vienna, 1970.

3. I. GĂLĂȚEANU, „Possible artifacts in the Chromatographical Determination of Radiochemical Purity of ^{35}S and ^{75}Se Labelled Methionine", ibidem.

4. I. GĂLĂȚEANU, „Determination of Radiochemical Purity, IAEA Laboratory Activities, Second Report 1965, Technical Reports Series nr. 41, p. 13 și 64 IAEA, Viena, 1965.

5. I. GĂLĂȚEANU, Purity of radiochemical preparations", IAEA Laboratory Activities, Third Report 1966, Technical Reports, 1966. Technical Reports Series Nr. 55, p. 11—13; 82, IAEA, Viena, 1966.

6. I. GĂLĂȚEANU, „Raport de activitate AIEA. Aspecte ale purității radiochimice a unor compuși radiofarmaceutici (intercomparare)", Laboratorul AIEA, Seibersdorf, Viena, 1968.

7. R.J. BAYLY, „Radioactive Pharmaceutical, Proc. Symp. Oak Ridge, 1—4 Nov. 1965, USAEC, 1966.

8. C. MĂNTESCU, A. GENUNCHE, L. SIMIONESCU, „Proceedings of the Symposium on Radiopharmaceuticals and Labelled Compounds", Copenhagen, 26—30 Mar. 1973, IAEA, Viena, 1973.

9. H.N. WAGNER JR., Panel on Preparation and Control of „Radiopharmaceuticals from Generator produced Radionuclides" IAEA, Viena, 11—15 May 1970.

10. Research Report, Medical Division, Oak Ridge Institute of Nuclear Studies; ORINS—53, 1965.

11. „Dynamic Clinical Studies with Radioisotopes". Proc. Symp. Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Oct. 21—25, 1963, Editors R.M. Kniseley, W. Newlon Tauxe, E. B. Anderson USAEC, June, 1964.

12. „In vitro procedures with radioisotopes in medicine". Proc. Symp. IAEA/WHO, Viena, 8—12 sept. 1969; IAEA, Viena, 1970.

13. „Medical radioisotope Scintigraphy", vol. I—II. Proc. IAEA. Symp., 23—28 oct. 1972, Monte Carlo, IAEA, Viena, 1973.

14. „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", Col. I—II Proc. IAEA/HWO „Symp. on New developments in radiopharmaceuticals and labelled compounds. Cophenhagen, 26—30 March 1973, IAEA, Viena, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

CONTROLUL DE CALITATE AL COMPUȘILOR MARCAȚI ȘI RADIOFARMACEUTICI

6.1. CONCEPTUL CONTROLULUI DE CALITATE

Compușii organici marcați cu izotopi radioactivi, în special compușii radiofarmaceutici, după preparare și înainte de a fi utilizați sînt supuși controlului analitic al purității lor radiochimice și radionuclidice. Acest control devine necesar cu atît mai mult cu cît actualmente se cunoaște că orice compus marcat și în special compușii organici radioactivi (radiofarmaceutici) suferă în timp o descompunere.

Criterii de puritate. Noțiunea de puritate, aplicată la compușii radioactivi, este o noțiune complexă. Aceasta implică cel puțin trei aspecte sub care trebuie considerată :

a) puritatea radiochimică,
b) puritatea radionuclidică,
c) puritatea chimică.

a) *Puritatea radiochimică,* conform definiției date în cap. 1, este exprimată prin procentajul activității atribuite unei anumite forme radiochimice, prezentă în compusul radiofarmaceutic respectiv. Cu alte cuvinte, un compus radiofarmaceutic absolut pur nu trebuie să conțină altă specie radioactivă decît numai cea inițial stabilită.

De exemplu, cromatul de sodiu radioactiv ^{51}Cr absolut radiochimic pur, nu trebuie să conțină crom trivalent radioactiv, roz bengalul (tetraiodotetraclorofluoresceină) marcat cu ^{131}I, radiochimic pur, nu trebuie să conțină iod liber sub formă de iodură sau derivați ai roz bengalului ca triiod-, diiod- și monoiod-tetraclorfluoresceină, sau în tiroxină (tetraiodtironină) radiochimic pură trebuie să fie absente formele radioactive ca : triiodtironina, diiodtironina, tirosina, diiodtirosina etc., sau iodul liber.

b) *Puritatea radionuclidică* se definește ca fiind proporția din activitatea totală a unui compus radioactiv atribuită unui radionuclid inițial stabilit. În mod convențional, activitatea atribuită elementelor-fiice (descendente) nu se ia în considerare, de exemplu perechile de generatori : $Sr^{90}—Y^{90}$, $Nb^{95}—Zr^{95}$.

Un compus cu puritate radionuclidică absolută nu mai conține nici un alt radionuclid decît cel stabilit inițial. De exemplu, un compus marcat cu iod-131 declarat radionuclidic pur nu conține nici un alt izotop radioactiv, decît numai iodul-131. Prezența altor radionuclizi în compusul respectiv, ca telur-131, în iodura radioactivă chiar în cantități foarte mici 0,1 % sau ^{99}Mo în soluție de $Na^{99m}TcO_4$ ori ^{113}Sn în $^{113m}InCl_3$ se consideră impuritate radioactivă.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Puritatea chimică* este proporţia în care o substanţă chimică se găseşte într-o formă chimică dată (stabilită).

Condiţiile de puritate radiochimică şi radionuclidică pentru un compus radioactiv oarecare, variază de la caz la caz, funcţie de scopul urmărit în utilizarea lui şi de metoda de măsurare — (detectare). În general, în ceea ce priveşte puritatea radionuclidică se convine de multe ori ca o mixtură de izotopi radioactivi ai aceluiaşi element să fie considerată radionuclidic pură în cazul cînd măsurătorile respective se fac cu referinţă la o probă a materialului trasor original. Cu toate acestea, în anumite situaţii, acest procedeu nu este satisfăcător. De exemplu, prezenţa mercurului-203 (de viaţă lungă) într-un compus marcat cu mercur-197 (clormerodorină) poate conduce la doze de supraexpunere a pacienţilor cărora li s-au administrat astfel de preparate radionuclidic impure. Contaminarea cu alţi radioizotopi a compuşilor radiofarmaceutici, nu este permisă. În practică se întîlnesc astfel de cazuri cînd mici impurităţi radioactive pot erona rezultatele unor cercetări, mai ales cînd se studiază procese de difuzie, la care ia parte doar o mică parte a activităţii totale şi unde pot avea loc anumite reacţii secundare preferenţiale între impurităţile radioactive şi substanţa de bază, ceea ce poate schimba întreaga imagine a procesului studiat.

Condiţiile de puritate radiochimică, de asemenea pot să varieze pentru acelaşi produs radioactiv, în funcţie de destinaţia utilizării lui. De exemplu, în biosinteză, ca sursă de liberare a carbonului-14 se utilizează frecvent acetatul de sodiu marcat cu carbon-14, din care microorganismele sintetizează alţi compuşi marcaţi cu C-14. În acest caz nu este necesară o puritate radiochimică înaltă. Acelaşi acetat de sodiu C-14 poate fi utilizat ca precursor în studii ale mecanismelor de biosinteză, de exemplu a unor steroide, unde se cere ca substanţa activă precursoare să aibă o înaltă puritate radiochimică.

Un alt aspect al purităţii radiochimice ce trebuie menţionat, este acel al poziţiei de marcare a compusului respectiv. Atunci cînd un compus marcat cu carbon-14 este utilizat ca trasor, poziţia de marcare nu prezintă importanţă. În cazurile în care molecula marcată suferă transformări chimice, datorită cărora se rupe lanţul atomilor de carbon (reacţii chimice, procese de metabolism etc.), poziţia de marcare capătă o importanţă deosebită. Prezenţa unei impurităţi radiochimice, de exemplu aceeaşi substanţă dar cu altă poziţie de marcare, ar putea conduce la rezultate complet eronate.

Puritatea chimică devine importantă mai ales în fazele dinaintea marcării sau în cazul materialelor-ţintă în reacţiile nucleare de obţinere a radioizotopilor. Astfel, în reacţiile nucleare (n, γ) prezenţa unor impurităţi chimice poate conduce la apariţia altor impurităţi radionuclidice şi radiochimice. O mai mare atenţie din punctul de vedere al purităţii chimice, în special prezenţa unor elemente toxice, se acordă materialelor şi substanţelor chimice ce sînt utilizate în producerea compuşilor radiofarmaceutici (materie primă, solvenţi reactivi etc.) şi a celor fără purtător, cu destinaţie medicală.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. METODE DE DETERMINARE A PURITĂȚII RADIONUCLIDICE ȘI RADIOCHIMICE

6.2.1. METODE DE DETERMINARE A RADIOACTIVITĂȚII

Măsurarea activității preparatelor radioactive (compuși marcați, compuși radiofarmaceutici, surse radioactive etc.) se realizează cu ajutorul unor instalații numite în general „numărători" de impulsuri care se compun în principal din :

a) un detector de reacții nucleare (α, β, γ) care poate fi un contor Geiger-Müler pentru radiații, contor G—M cu fereastră pentru radiații $\beta + \gamma$, contor cu umplere internă (camere de ionizare) pentru radiații α sau β moi, cameră de ionizare pentru γ și β dure și scintilatori cu cristale de NaI (Tl) sau Ge—Li, pentru γ și scintilatori lichizi pentru radiații $\beta + \gamma$ moi și în final camere de ionizare speciale pentru particule α. Fiecare din acești contori (camere de ionizare) se pot categorisi în mai multe tipuri funcție de scopul utilizării și a energiei radiației emise ;

b) un preamplificator de impulsuri (care poate fi și un fotomultiplicator în cazul detectorilor cu cristale NaI (Tl sau Ge—Li) ;

c) partea electronică de amplificare, de numărare și de afișare numerică, a impulsurilor (dezintegrărilor).

În prezent există o varietate largă de metode și aparate de determinare și înregistrare a radiațiilor nucleare ; pentru documentare cititorul este îndreptat să consulte bogata literatură de specialitate între care citățm [1—14].

6.2.2. METODE DE DETERMINARE A PURITĂȚII RADIONUCLIDICE

Dintre metodele uzuale și precise de determinare a purității radionuclidice a radiofarmaceuticelor citățm spectrometria gamma.

Metoda spectrometriei gamma este în prezent singurul mijloc de analiză rapid, precis și complet de determinare a compoziției radionuclidice a unor amestecuri radioactive ce conține emițători gamma. Deși această metodă se bucură în prezent de o largă aplicare, ea este încontinuu perfecționată în scopul eliminării unor erori, pe de o parte, ce se introduc de aparatură în determinările curente, datorită neliniarității, deplasării canalelor, interferenței unor fotopicuri etc., și pe de altă parte a creșterii gradului de sensibilitate (detectare de ultramicrocantități de radionuclizi) și de rezoluție.

În cadrul acestei metode în prezent există diferite procedee de analiză a spectrelor gamma în scopul determinării compoziției acestuia, dintre care amintim cîteva mai importante.

a) Eliminarea succesivă din spectru a radionuclizilor ce posedă energii înalte ale fotopicurilor, pînă ce întreaga structură a spectrului a fost rezolvată. Această substracție succesivă se poate efectua fie cu ajutorul unui computer analog sau cu computer digital. În aceste cazuri de golire a spectrului gamma se iau în considerare numai impulsurile din regiunea fotopicului respectiv, cu condiția ca acesta să nu interfere cu alte foto-

picuri, altfel pot fi introduse erori apreciabile, mai ales în cazul estimării fotopicurilor mici învecinate cu altele mai mari.

Deoarece erorile se însumează, procedeul eliminării succesive poate să ducă la erori ce depăşesc valoarea estimativă a însuşi fotopicului respectiv.

b) Un alt procedeu folosit în interpretarea spectrelor gamma este acela de a înscrie simultan ecuaţii pentru „n" concentraţii radionuclidice funcţie de numărul de impulsuri obţinute în fotopicurile respective. Acest procedeu permite o evaluare mai bună decît procedeul a) atunci cînd fotopicul respectiv interferă cu altul.

c) Procedeul celor mai mici pătrate devine tot mai răspîndit în practica curentă de determinare a concentraţiilor radionuclizilor în amestecuri radioactive, în cadrul spectrometriei gamma. Acest procedeu permite o estimare a unui număr destul de mare de concentraţii pentru diferite situaţii, fiind eficient şi precis fără vreo alterare a conceptului de estimare.

d) Procedeul regresiei succesive şi multiple este o combinaţie a procedeelor a) şi c). Acest procedeu este general şi poate fi aplicat la amestecuri radioactive ce conţin pînă la 60 radionuclizi, dacă se dispune de spectrele standard ale radionuclizilor respectivi.

În scopul unei interpretări mai aprofundate a spectrelor gamma, se recomandă consultarea lucrărilor [5, 7, 11, 38, 39].

6.2.3. METODE DE DETERMINARE A PURITĂŢII RADIOCHIMICE

6.2.3.1. Cromatografia pe hîrtie şi în strat subţire. Determinarea purităţii radiochimice a produselor radiofarmaceutice şi compuşilor marcaţi, actualmente se face în mod curent cu ajutorul tehnicilor cromatografice însoţite de măsurarea activităţii spoturilor sau a fracţiunilor de soluţii, după separarea impurităţilor radiochimice.

În acest scop dintre tehnicile cromatografice, cromatografia pe hîrtie (cu developare ascendentă sau descendentă) şi în strat subţire sînt cele mai des utilizate.

Principiile şi tehnicile de lucru pentru ambele cazuri sînt descrise într-o serie de lucrări [15—20 şi 21—29], fapt pentru care în prezenta monografie aceste probleme se consideră cunoscute.

În ceea ce priveşte cromatografia pe hîrtie, se utilizează benzi lungi de circa 35—40 cm şi late de 3 cm pe care se pipetează substanţa radioactivă, pe mijlocul benzii la distanţa de 3 cm de la capătul inferior. Capăt inferior se consideră acel capăt al benzii de hîrtie care se va introduce în baia de solvent developant şi care la rîndul său este ales astfel încît sensul de laminare al hîrtiei cromatografice (indicat pe pachetul de hîrtie Whatman sau orice altă marcă) să coincidă cu sensul de migrare (developare) al solventului. Pentru cromatografia în strat subţire se folosesc plăci de sticlă cu dimensiunile de 5 × 20 cm pe care se depune un strat de adsorbant de silicagel, celuloză, oxid de aluminiu sau alţi adsorbanţi, de grosime circa 250 μ. Pipetarea substanţei de analizat se face de asemenea la distanţa de 3 cm de la capătul inferior al plăcii.

După developare, benzile sau plăcuţele se scot din tancul cromatografic şi se usucă în curent de aer în etuve la temperatură moderată ce nu depăşeşte 35—40°C.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea spoturilor cromatografice, rezultate în urma separării impurităţilor radiochimice de substanţa de bază (produsul radiofarmaceutic) se face ca de obicei prin scanare la un aparat specializat denumit „scanner cromatografic" sau prin tăierea benzilor de hîrtie, după developare în bucăţi de 0,5 sau 1 cm şi urmată de măsurarea activităţii lor cu ajutorul unui numărător de impulsuri cu contor G—M în geometrie 2π sau 4π sau detector cu cristal de NaI(Tl) cu puţ. Funcţie de volumul (1 — 20µl), concentraţia chimică (0,5—100 µg) şi concentraţia radioactivă (10—500 µCi) pipetate pe benzi sau plăci şi ale căror valori depind de natura produsului analizat, de energia şi de tipul radiaţiei emise de radionuclidul cu care este marcat radiofarmaceuticul respectiv, identificarea spoturilor cromatografice, afară de reacţiile cu reactivi specifici, se mai poate realiza şi cu ajutorul autoradiografiei. Aceasta se utilizează tot mai frecvent în cazul cromatografiei în strat subţire, unde nu se cer filme cu dimensiuni mari. După identificarea spoturilor, are lor determinarea valorilor R_f cu ajutorul relaţiei :

$$R_f = \frac{\text{distanţa de migrare a substanţei (centrul spotului)}}{\text{distanţa de migrare a solventului}}$$

Pentru înlăturarea efectelor negative provocate de temperatură, concentraţie şi anumite condiţii locale, asupra valorilor R_f, acolo unde se permite, alături de cromatogramele substanţelor destinate analizei purităţii radiochimice, se mai developează în condiţii identice şi cromatograme standard (cu substanţe martor). Cunoscînd valorile R_f pentru spoturile supuse analizei radiochimice se pot astfel identifica impurităţile radiochimice din produsul respectiv.

Pentru determinările cantitative, ale impurităţilor radiochimice, se face mai întîi o măsurare a activităţii tuturor spoturilor (radioactive) ce apar pe cromatogramă, a căror activitate însumată reprezintă activitatea totală. Valoarea în procente a fiecărei impurităţi radiochimice localizată într-un anumit spot se calculează conform relaţiei :

$$\text{Imp. } \% = \frac{\text{impuls/min. spot impuritate} - F}{\text{impuls/min. activitate totală} - F} \times 100,$$

în care F reprezintă numărul de impulsuri/minut atribuit fondului.

Puritatea radiochimică se calculează folosind relaţia :

$$\text{Puritate } \% = \frac{P}{P + \Sigma (I + F)\, t_1 - F t_2 \cdot \frac{t_1}{t_2}} \times 100, \qquad (6.1)$$

în care P reprezintă numărul de impulsuri/minut înregistrate pentru spotul principal (al produsului radiofarmaceutic) ; I numărul de impulsuri/minut pentru spotul impurităţii radiochimice, care poate fi o sumă de mai multe spoturi, F numărul de impulsuri/minut dat de fondul cosmic şi mediul ambiant, t_1 timpul de măsurare a activităţii spotului impurităţii radiochimice şi t_2 cel al fondului.

Pentru cazul cînd puritatea radiochimică a unui produs radiofarmaceutic sau compus marcat este mai mare de 90%, ceea ce se întîmplă

Scanned with OKEN Scanner

în majoritatea cazurilor, puritatea radiochimică se poate calcula conform formulei :

$$\text{Puritatea } \% = 100 - \frac{It_1 + Ft_2 - Ft_2 \cdot t_1/t_2}{P} \times 100 = 100(1 - \alpha),$$

unde α reprezintă fracţiunea (suma) tuturor impurităţilor radiochimice prezente în produsul respectiv.

Atunci cînd avem un număr mai mare de probe de măsurat, din acelaşi produs, în determinarea purităţii radiochimice se impune calculul deviaţiei standard $\sigma(\alpha)$ cu ajutorul formulei :

$$\sigma^2_{(\alpha)} = \frac{\alpha}{P} + \frac{F(t_1t_2 + t_1)^2}{P^2t_2}. \qquad (6.2)$$

Pentru exemplu considerăm că rata de numărare a impulsurilor $P = 500$ imp/s ; t_0 timpul de măsurare a spotului (picului) principal ≈ 80 s ; rata de numărare a fondului $F = 10$ imp/s ; t_2 timpul de măsurare a fondului $=$ $= 200$ s ; t_1 timpul de măsurare a spoturilor impurităţilor în care nu se include $t_0 = 800$ s. Deoarece rata de numărare P a picului principal se ia la jumătatea înălţimii lui (1/2 din lărgime) în cazul de mai sus, $P \approx 20000$ impulsuri. Considerînd că puritatea radionuclidului unui compus este de 97 %, adică $\alpha = 0{,}03$, deviaţia standard se calculează astfel

$$\sigma^2_{(\alpha)} = \frac{0{,}03}{20000} + \frac{10}{4 \cdot 10^8}\left(800 + \frac{640000}{200}\right) = 1{,}01 \cdot 10^{-4}; \quad \sigma_{(\alpha)} = 0{,}01.$$

Determinarea purităţii radiochimice la o serie de produse radiofarmaceutice ce conţin techneţiu-99m şi indiu-113m folosind cromatografia pe hîrtie şi în strat subţire este descrisă în lucrările [30, 31].

6.2.3.2. **Electroforeză.** Metoda electroforezei pe hîrtie este un mijloc eficient de determinare a purităţii radiochimice. Se bazează pe proprietăţile ce le au moleculele şi ionii în soluţia electrolit de a migra pe un suport (hîrtie de filtru sau geluri) la distanţe diferite sub influenţa unui cîmp electric. Viteza de migrare a moleculelor şi ionilor în soluţiile electrolit pe un suport oarecare depinde de o serie de factori, între care mai importanţi sînt : greutatea moleculară şi sarcinile electrice ale moleculei sau ionului respectiv, potenţialul (cîmpul) electric aplicat, temperatură etc. Dintre suporţii frecvent utilizaţi în acest scop menţionăm : hîrtia de filtru (Whatman sau altă marcă) acetat de celuloză-agar, celofan agar, geluri de amidon sau poliacrilamidă, răşini schimbătoare de ioni depuse în straturi subţiri pe hîrtie etc.

Pentru separarea fracţiunilor proteice se folosesc suporţi de gel de amidon sau de poliacrilamidă care în acest caz se comportă ca filtre moleculare. Uneori se aplică o separare (fracţionare) imunoelectroforetică.

În practică, mai frecvent se folosesc benzi de hîrtie de filtru lungi de 35—40 cm şi late de 3 cm pe care se depune substanţa de analizat la fel ca şi în cazul cromatografiei pe hîrtie, după ce benzile au fost umectate cu soluţie electrolit. Capetele benzilor se introduc în cuvele cu electrolit şi se aplică potenţialul indicat care de obicei se situează între 200 şi 1200 V funcţie de tipul aparatului şi de natura substanţei. Uneori, pentru separa-

Scanned with OKEN Scanner

rea unor molecule cu greutate moleculară mare şi sarcini electrice mici se recurge la potenţiale mari, de ordinul miilor de volţi şi în gradient de temperatură.

Timpul de migrare este în general de 30—120 minute, după care procesul electroforetic se întrerupe şi urmează detectarea spoturilor care poate fi realizată folosind reacţii chimice specifice, fluorescenţă cu radiaţii UV sau în cazul substanţelor radioactive, măsurînd activitatea spoturilor respective. Pentru control, acolo unde este posibil, se efectuează alături de electroforeză substanţelor destinate analizei şi electroforeza unor substanţe „martor" cu care în final se compară valorile R_m şi care se determină cu ajutorul relaţiei:

$$R_m = \frac{\text{Distanţa de migrare a moleculei de bază}}{\text{Distanţa de migrare a moleculei sau ionului impuritate}}.$$

Calculul purităţii radiochimice prin metoda electroforetică se efectuează la fel ca şi în cazul cromatografiei pe hîrtie sau în strat subţire. În cazul cînd în laboratorul respectiv nu se dispune de o instalaţie completă de determinare a activităţii spoturilor prin integrarea (însumare) şi înregistrarea picurilor pe hîrtie milimetrică (semilogaritmică), calculul purităţii radiochimice se poate face fie prin măsurarea suprafeţei picurilor, fie prin cîntărirea lor (gravimetrie) după ce acestea au fost decupate din benzi de hîrtie pe care au fost înregistrate:

$$\text{Puritate } \% = \frac{\text{Suprafaţa picului substanţelor radiofarmaceutice}}{\text{Suprafaţa picului substanţelor radiofarmaceutice} + \text{suprafaţa picului substanţelor impuritate}} \times 100.$$

În mod similar puritatea radiochimică se poate calcula folosind în locul valorilor suprafeţelor picurilor, greutăţile obţinute prin cîntărirea picurilor respective.

Aplicaţiile electroforezei la determinarea purităţii radiochimice a pertechnetatului de sodiu privind separarea şi detectarea impurităţilor de molibden-99 sînt descrise în lucrarea [30].

6.2.3.3. **Spectrofotometria.** Metoda spectrofotometrică nu este o metodă caracteristică determinării purităţii radiochimice, ci în general controlului de calitate. Astfel, în multe cazuri este necesară determinarea concentraţiei chimice a unor radiofarmaceutice în soluţii după procesarea lor, ca de exemplu roz-bengalul, hipuranul, serumalbumina etc. Spectrofotometria se bazează pe fenomenul de absorbţie (atenuare) a unui fascicul luminos (spectru vizibil sau spectru ultraviolet) cînd acesta traversează printr-o soluţie oarecare, conform legii Lambert-Beer şi a cărei relaţie matematică este:

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon c l, \qquad (6.3)$$

unde $\log I_0/I_t = A$ = absorbţia, I_0 intensitatea fasciculului incident, I_t intensitatea fasciculului atenuat după traversarea soluţiei (mediului), ε coeficientul de extincţie, c concentraţia substanţei în soluţie (g/l sau moli/l), l grosimea stratului de lichid prin care a străbătut fasciculul de lumină (lăţimea cuvetei), în cm.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru determinarea concentrației unei substanțe este necesar a se ridica curba de calibrare de concentrații cunoscute. Astfel, punînd pe ordonată valorile lui A iar pe abscisă valorile concentrației se obține o dreaptă, la lungimi de undă constante ale fasciculului luminos. Cu ajutorul acestei drepte se pot determina valorile concentrației unei substanțe care se află în soluție și a cărei concentrație este necunoscută. Este de menționat că valabilitatea legii Lambert-Beer este numai pe porțiunea dreptei unde se păstrează liniaritatea. În afara acestor limite ale acestei legi trebuie să se facă diluția soluției respective pînă la obținerea liniarității sau să i se aducă corecții care, uneori, o fac inaplicabilă.

6.2.3.4. **Diluția izotopică.** Metoda diluției izotopice este tot mai frecvent utilizată pentru determinarea purității radiochimice, datorită avantajelor pe care le prezintă față de alte metode. Principiul acestei metode se descrie astfel [32]: se ia o cantitate determinată W_0 de substanță radiofarmaceutică marcată cu un radionuclid oarecare ce are o activitate Λ_0. Considerăm că avem un amestec ce conține o substanță neradioactivă ce are greutatea W_x grame și care este necunoscută. În acest amestec, cu ajutorul acestei metode se poate determina concentrația unui izotop stabil într-o substanță oarecare.

În acest scop radionuclidul utilizat este indicat a fi un izotop al aceluiași element ca și izotopul stabil al substanței supuse analizei. Cantitatea de radionuclid se introduce în proba de analizat și se omogenizează, după care ultima devine radioactivă, deoarece atomii radionuclidului sau cei ai izotopului stabil din substanța inactivă se comportă identic în toate reacțiile și operațiile chimice, avînd loc un schimb izotopic. După omogenizare, dacă în amestecul respectiv există mai multe substanțe, se procedează la separarea substanței destinate analizei, printr-o metodă adecvată (extracție cu solvenți, cromatografică, schimb ionic etc.). Greutatea substanței separate o notăm cu W_2(grame) și activitatea ei cu Λ_2. În acest caz $W_2 = (W_x + W_0)$ recuperat.

Deoarece pierderile de substanță în procesul de separare sînt proporționale cu pierderile de activitate, putem scrie:

$$W_2 = (W_x + W_0)\frac{\Lambda_2}{\Lambda_0}$$

sau (6.4)

$$W_x = W\frac{\Lambda_0}{\Lambda_2} - W.$$

Pentru evitarea erorilor mari în determinarea lui W se recomandă ca W_0 să aibă valori mult mai mici decît W_2, astfel ca diferența dintre acești parametri să fie cît mai mare. Deoarece raportul W_2/Λ_2 reprezintă activitatea specifică a probei după omogenizare, relația (6.4) se poate scrie și astfel:

$$W_x = W_0\left[\frac{\Lambda_0 W_2}{\Lambda_2 W_2} - 1\right] = W_0\left(\frac{S_0}{S_2} - 1\right). \quad (6.5)$$

6.2.3.5. **Alte metode.** Afară de metodele sus-menționate, care de fapt sînt cele mai des utilizate în practică pentru determinarea purității radiochimice, uneori se recurge și la alte metode fizice și chimice.

Dintre metodele cromatografice, cromatografia de gaze şi schimbul ionic vin să completeze posibilităţile largi oferite de acestea [33,34]. O serie de compuşi marcaţi cu tritiu, carbon-14, seleniu-75, sulf-35 şi cu alţi radionuclizi se analizează în mod curent prin metoda cromatografiei gazoase, iar unele produse radiofarmaceutice marcate cu iod-131, iod-125, fosfor-32, indiu-111 şi crom-51 se purifică sau li se pot determina puritătile radiochimice prin metoda schimbului ionic sau filtrare pe coloane cromatografice cu geluri de tip dextran (Sephadex) [35—37].

Extracţia cu solvenţi, de asemenea, oferă în unele cazuri posibilităţi de determinare a purităţii radiochimice.

Un rol important în determinarea purităţii radiochimice îl au reacţiile specifice. Astfel, cu ajutorul acestor reacţii se pun în evidenţă urme extrem de mici ale unor ioni metalici neradioactivi în produsele radiofarmaceutice, de exemplu, zirconiul în eluatul de la generatorul de indiu-113m sau aluminiul în eluatul de pertechnetat de la generatorul de technetiu-99m [30, 31].

Într-o măsură mai mică şi acolo unde dotarea materială a laboratoarelor permite, pentru determinarea unor impurităţi radiochimice şi chimice se mai foloseşte şi metoda rezonanţei magnetice nucleare sau cea a rezonanţei electronice de spin, care în majoritatea cazurilor trebuie cuplate şi cu alte metode analitice.

Dimensiunile particulelor coloidale sau ale micro- ori macroagregatelor se determină cu ajutorul microscopiei. Pentru valori ce nu necesită o precizie prea mare, de exemplu în cazul macroagregatelor se folosesc microscoape obişnuite de laborator, iar pentru particulele coloidale şi macroagregate se utilizează microscopul electronic.

6.2.4. CONTROLUL BIOLOGIC

Produsele radiofarmaceutice destinate administrării pe oameni trebuie să fie sterile, apirogene, izotonice şi netoxice, fapt pentru care se supun unui control biologic. Determinarea sterilităţii se face prin incubarea în medii de cultură microbiene prin însămînţarea lor cu probe adecvate din produsele radiofarmaceutice.

Însămînţarea probelor pentru controlul sterilităţii se efectuează în nişă specială în condiţii aseptice. Aceste condiţii se realizează menţinînd incinta sub acţiunea razelor ultraviolete timp de o oră înainte de începerea lucrului. Din fiecare şarjă de produs radioactiv se recoltează probe pentru controlul sterilităţii. Fiolele cu produs radioactiv sînt introduse în nişa sterilă, sînt şterse cu un tampon de vată îmbibat cu alcool. Se desface dopul cu un cleşte steril şi se recoltează cu o pipetă sterilă, deasupra unei surse de căldură, cîte 0,5 ml probă activă şi se însămînţează în mediile de cultură I şi II specificate în Farmacopeea română.

Tuburile însămînţate cu mediul de cultură se introduc în conteinere de plumb special confecţionate. Cele însămînţate cu mediul de cultură I ce conţine tioglicolat (pentru teste de microbi aerobi şi anaerobi) se menţin 5 zile la 37°C ± 1°.

Tuburile însămînţate cu mediul de cultură II Sabouraud pentru teste de ciuperci) se menţin 7 zile la 22°C — 24°C. Verificarea tuburilor se face zilnic pe toată perioada de incubaţie, iar primul rezultat se citeşte după 24 ore. Probele analizate se consideră sterile dacă în cele două tuburi ce

Scanned with OKEN Scanner

conţin medii de cultură însămînţate, prin examen macroscopic (vizual) sau microscopic nu se observă o creştere de microorganisme.

În cazul cînd preparatele însămînţate în mediile de cultură provoacă de la început unele modificări în transparenţa iniţială a mediilor de cultură I şi II, verificarea unei eventuale creşteri microbiene se determină prin treceri repetate pe medii de cultură solide şi lichide.

Controlul sterilităţii produselor radioactive se poate efectua şi prin test biologic.

O cultură sporulată de *Bacillus Stearothermo-phillus* se îmbibă în fire de bumbac sau mătase şi se închide în tuburi de sticlă sterile, după sterilizare odată cu şarja de produs radioactiv se sparge tubul şi conţinutul se însămînţează în mediul de cultură.

Dacă după 24 de ore mediul de cultură rămîne steril, sterilizarea a fost realizată în condiţii bune.

Apirogenitatea produselor radiofarmaceutice se determină injectînd cîte 0,25 — 9,5 ml de soluţie radioactivă sau neradioacţivă în 3 iepuri de greutate 2—4 kg. Animalelor, înainte cu 4 ore de injectarea produsului li se măsoară temperatura corpului (rectal) care trebuie să fie cuprinsă între 38,9 şi 39,8°C şi fără variaţii mai mari de 0,2°C, în decurs de 20 minute. Injectarea la iepuri se face în vena marginală a unei urechi. Volumul soluţiei injectate raportat la kg-corp se ia totdeauna mai mare de 3—5 ori decît cel administrat la oameni. Astfel, citirea temperaturii rectale se face la intervale de 60, 90 şi 120 minute de la momentul injectării. Produsul se consideră apirogen dacă suma variaţiilor temperaturii celor 3 iepuri nu depăşeşte 1,4 °C.

Testul de toxicitate se realizează pe loturi de 5 şoareci albi de greutate 20—30 g cărora li se injectează în vena dorsală a cozii cîte 0,1—0,2 ml de soluţie ce conţine substanţa de testat, nediluată. Injectarea nu trebuie să dureze mai mult de 5 s. După 6 ore de la injectare se face constatarea cîţi şoareci au supravieţuit. Dacă din cei 5 şoareci au supravieţuit numai o parte, în acest caz se repetă testul pe un alt lot de 5 şoareci albi şi constatarea se face la minimum 24 ore. Este important de menţionat faptul că uneori moartea animalelor poate surveni drept urmare a unei injectări necorespunzătoare, prin introducerea de bule de aer, ceea ce produce o moarte rapidă prin embolie gazoasă.

Volumul injectat în şoareci raportat la kg-corp este de 100—500 de ori mai mare decît la oameni. În acest mod testul de toxicitate se consideră valabil şi produsul netoxic dacă toate animalele supravieţuiesc cel puţin 24 de ore. Pentru studii detaliate animalele se sacrifică şi li se determină activitatea localizată în diferite organe în sînge şi eventualele modificări survenite în acestea.

Izotonicitatea soluţiilor injectabile se poate determina prin metoda conductometrică folosind ca etalon o soluţie fiziologică de 0,9% NaCl, sau prin metoda crioscopică.

BIBLIOGRAFIE

1. A.S. Sanielevici, „Radioactivitatea", vol. 1, Edit. Academiei, Bucureşti, 1956.
2. G. Friedlander, J.W. Kennedy, „Introduction to Radiochemistry", J. Wiley Inc., New York, 1949.
3. A.M. Nesmeianov, V. Baranov et al., „Lucrări practice de radiochimie", Edit. tehnică, Bucureşti, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

4. G.B. Cook, J.F. Duncan, „Modern Radiochemical Practice", Oxford, 1952.
5. E.L. Stolayrova, „Applied Spectrometry of Ionizing Radiation", A.E.C. — tr. — 6698, 1964, trad. din l. rusă, Atomizdat, Moscova, 1964.
6. F. Fosati, „Quantities units and measuring methods of ionizing radiation", U. Hoelpi, Milan, Italy, 1959.
7. I. Gălăţeanu, „Radiochimia aplicată. Metode şi probleme", Edit. Academiei, Bucureşti, 1976.
8. A. Berinde, M. Grecescu et al., „Probleme rezolvate de tehnică nucleară". Edit. tehnică, Bucureşti, 1972.
9. F. Ciorăscu, M. Oncescu, „Detectarea şi măsurarea radiaţiilor nucleare", Edit. Academiei, Bucureşti, 1964.
10. M. Grecescu, *Tehnica nucleară*, **1**, No. 1 şi 2 (1958).
11. C.E. Crouthammel, „Applied Gamma Ray Spectrometry", Pergamon Press, London, 1960.
12. J.S. Sharpe, „Nuclear radiation measurement", Temple Press Ltd., London, 1960.
13. O. Şandru, A. Ţopa, „Radionuclizii", Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
14. S. Ionescu, „Elemente de radiochimie", Edit. tehnică, Bucureşti, 1959.
15. E. Lederer, „Journée de la cromatographie sur papier", Ed. Mason et Cie, Paris, 1952, p. 845.
16. E. Lederer, M. Lederer, „Cromatography", Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1965.
17. S. Aronoff, „Techniques of Radiobiochemistry", the Iowa State College Press, Iowa, 1956.
18. R. Block, „Aminoacid Handbook", Thomas Publ. Springfield, Illinois, 1959.
19. E. Merck, „Cromatography", E. Merck-A.G. Darmstádt, 1962.
20. T. Năşcuţiu, „Cromatografia pe hîrtie a substanţelor anorganice", Edit. Academiei, 1961.
21. E. Vernon Trutter, „Thin-film Cromatography", Cleaver Hume Press Ltd., London, 1963.
22. J.M. Bobitt „Thin-Layer Chromatography", Reinhald Publishing Corp., New York, 1963.
23. G. Marini-Bettolo, „Thin-Layer Chromatography" American Elsevier Publ. Co., New York, 1964.
24. A. Randerath, „Thin-Layer Chromatography", Academic Press Inc., New York, 1964.
25. F. Snyder; *Review TLC* Atomlight (NEN corp) No. 58, Feb. 1967.
26. F. Snyder, *TLC Radioassay* (Reveiw in Advances in Tracer Methodology, vol. 4, Ed. Seymour Rothchild, Plemem Press, New York, 1968.
27. — *Journal of Chromatography* „Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography", 1961—1965.
28. E. Stahl, „Thin-Layer Chromatography, a Laboratory Hand Book", Acad. Press Inc. Publ., New York — London, 1965.
29. Camag „Thin-Layer Chromatography", Cumulative Bibliography, 1965—1967; 1967—1968; 1968—1970.
30. I. Gălăţeanu, M. Roman, I. Zamfir, V.V. Lungu, C. Uncuţa, G. Fodor, *J. Radioanalytical Chem.*, **26**, 189 (1975).
31. I. Gălăţeanu, I. Zamfir, V.V. Lungu, Preprint RF—1—1974—Generatorul de indiu-113m CSEN—IFA, 1974.
32. J. Tölgyessy, T. Braun, M. Kyrš, „Isotope Dilution Analysis", Akadémiai Kiado, Budapest, 1972.
33. O. Piringer, „Cromatografia gazoasă", Edit. tehnică, Bucureşti, 1967.
34. C. Sabău, „Schimbul ionic", Edit. Academiei, Bucureşti, 1967.
35. Pharmacia-Fine Chemical, Literature Reference 1959—1968, UPSALA, —1969.
36. Pharmacia-Fine chemicals, Literature References 1970.
37. Pharmacia-Fine Chemicals, Literature References 1971—1973.
38. J. Perdijon; L'analyse par activation; Traitement des informations en Spectrometrie gamma après l'irradiation aux neutrons. Masson et Cie Editeurs, Paris, 1967.
39. B. A. Rhodes (editor), Quality Control in Nuclear Medicine. Radiopharmaceuticals, instrumentation and in vitro assays" The C.V. Mosby Co. Saint Louis, 1977.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA A II-A

PRODUSE RADIOFARMACEUTICE CU UTILIZARE DIAGNOSTICĂ ÎN MEDICINĂ

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

PRINCIPII GENERALE PRIVIND UTILIZAREA DIAGNOSTICĂ A PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

Dezvoltarea rapidă a medicinii nucleare contemporane este condiţionată de găsirea unor noi produse radioactive cu eficienţă superioară pe plan diagnostic sau terapeutic. Numărul mare de substanţe radioactive propuse în acest scop, implicaţiile medicale, organizatorice şi legislative legate de introducerea şi utilizarea lor în practica medicală a condus la conturarea unui nou domeniu interdisciplinar, cel al produselor radiofarmaceutice (PRF).

PRF sînt surse radioactive deschise ce îndeplinesc condiţiile farmacologice pentru administrare la om în scop diagnostic, terapeutic sau de cercetare ştiinţifică. Din punct de vedere medical cea mai judicioasă încadrare şi tratare a problemei PRF este de pe poziţia farmacologiei clinice. Ţinînd seama de faptul că PRF sînt predominant folosite în scop diagnostic şi avînd în vedere caracterul de trasori radioactivi al acestor produse, se impune abordarea respectivei problematici într-o optică farmacocinetică. Plecînd de la conceptul integrării PRF în cadrul farmacologiei experimentale şi clinice vom trata în continuare trei grupe de probleme generale prezentînd interes medical şi anume : elemente de radiofarmacocinetică, criteriile PRF optim, precum şi aspecte de farmacovigilenţă în utilizarea lor diagnostică.

1.1. ELEMENTE GENERALE DE RADIOFARMACOCINETICĂ

Farmacologia clinică deosebeşte trei faze succesive în interacţiunea organism-medicament : faza farmaceutică, faza farmacocinetică şi faza farmacodinamică [1].

Faza farmaceutică, definită prin relaţia timp-concentraţie la locul de absorbţie este, în general, puţin importantă pentru PRF, care sînt administrate mai ales pe cale intravenoasă. Probleme de disponibilitate farmaceutică pot fi întîlnite în cazul utilizării capsulelor gelatinoase de radioiodură administrate per os.

Faza farmacocinetică cuprinde absorbţia, distribuirea în organism, modificările metabolice şi căile de eliminare a produsului, respectiv disponibilitatea biologică a medicamentului. Aspectele biocinetice sînt primordiale atît în studiul cît şi în utilizarea diagnostică a PRF.

Faza farmacodinamică constă în acţiunea medicamentului asupra materiei vii cu producerea efectului farmacologic scontat pe plan terapeutic. În cazul PRF diagnostice faza farmacodinamică nu există, întrucît traso-

rii radioactivi — prin definiţie — nu produc modificări în sistemul pe care îl explorează. De aceea, denumirea de „produs radiofarmaceutic" nu este acceptată pe plan diagnostic de către toţi autorii, argumentîndu-se că această formulare ar implica existenţa unor efecte farmacodinamice, pe care însă noţiunea de trasor radioactiv le exclude a prioric. Chiar dacă etimologic termenul de produs radiofarmaceutic nu este întru totul riguros, pe plan semantic această denumire, adoptată în medicina nucleară, acoperă în mod adecvat conţinutul noţiunii discutate.

1.1.1. NOŢIUNI ŞI TERMINOLOGIE ÎN RADIOFARMACOCINETICĂ

Nomenclatura cineticii trasorilor radioactivi, problemă mult discutată şi disputată, ducînd deseori la confuzii generate de utilizarea unor terminologii diferite pentru acelaşi fenomen, a fost mult uniformizată în ultimul deceniu [2, 3].

Noţiunea de *sistem* este utilizată pentru a delimita de restul universului acea parte din univers în al cărei studiu sîntem interesaţi. În această modalitate generală de abordare termenul „sistem" nu trebuie confundat cu sistemele anatomice sau funcţionale din terminologia medicală curentă. Un sistem farmacocinetic poate include noţiuni generale sau particulare de ordin anatomic, fiziologic sau metabolic, la nivel de organism, organ, ţesut sau celulă, funcţie de problema abordată şi de modalitatea tratării ei. Sistemele pot fi compuse din *compartimente*, reprezentînd un număr finit de regiuni sau faze, despărţite prin limite de separare, avînd ca factor comun existenţa unor activităţi specifice uniforme în interiorul fiecărui compartiment; limitele de separare ale compartimentelor sînt „graniţe" reale sau conceptuale, bazate pe criterii fizice, chimice sau biologice. *Trasorul* se concretizează în particule sau membri marcaţi ai unei populaţii folosiţi pentru măsurarea unor proprietăţi ale sistemului ales. Trasorul ideal, alături de proprietatea de a fi detectabil şi măsurabil de către investigatorul sistemului, trebuie să fie identic din punct de vedere calitativ cu proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale componentei urmărite, iar în termeni cantitativi să fie neglijabil, comparativ cu componenta urmărită în sistem.

Definiţiile de mai sus, aplicabile în orice domeniu al cineticii trasorilor (medicină, biologie, hidrologie etc.) se cer a fi nuanţate în domeniul PRF şi biocineticii lor. Într-o tratare riguroasă a problemei numai o mică parte din PRF actuale rezistă la confruntarea cu definiţia noţiunii de radiotrasor, şi acestea sînt reprezentate de componente normale ale organismului pentru care dispunem de izotopi radioactivi (radioiodură, radiofier) sau care sînt marcate intrinsec (serum albumină umană, tiroxină, triiodotironină, toate marcate cu radioiod, apa tritiată etc.). Marea majoritate a PRF actuale deşi îndeplinesc funcţiile diagnostice pentru care au fost concepute şi produse nu pot fi încadrate în definiţia riguroasă a radiotrasorului; este atît cazul bioanalogilor (mai mult sau mai puţin perfecţi) cît şi al produselor de sinteză ce nu reprezintă componente normale sau patologice ale organismului uman. Majoritatea PRF sînt utilizate în cantităţi neglijabile comparativ cu componenta urmărită în sistem şi nu ajung să producă efecte farmacodinamice, deci să tulbure echilibrul sistemului explorat. Ca atare, în studiile de radiofarmacocinetică se foloseşte terminologia proprie domeniului cineticii trasorilor pentru parametrii de masă, volum,

Scanned with OKEN Scanner

timp şi viteză de schimb, dintre care, cei mai uzuali sînt definiţi, după Brownell şi colab. [2], în tabela 1.1. Pentru analiza biocineticii trasorilor se folosesc metodele ce reprezintă simulări matematice sau fizice ale atributelor unui sistem. În radiofarmacocinetică investigaţia sistemelor se efectuează prin analiză compartimentală, cel mai frecvent utilizate fiind modele bicompartimentale deschise. Modelările compartimentale constituie un domeniu biomatematic a cărui abordare depăşeşte cadrul lucrării de faţă, problematica respectivă constituind obiectul unor monografii de sine stătătoare [4, 5].

TABELA 1.1

Nomenclatura şi definiţia unor parametri folosiţi în cinetica trasorilor radioactivi

Natura parametrului	Nomenclatură	Definiţie	Dimensiunea
Masă sau volum	Fond metabolic comun (pool)	Cantitatea totală de substanţă dintr-un sistem sau subsistem.	masă
	Spaţiu de distribuţie	Volumul aparent ce rezultă din raportul dintre cantitatea de trasor reţinută şi concentraţia trasorului la locul de recoltare.	volum
Transfer	Cantitate transportată	Masa de material transferată unidirecţional, pe unitate de timp, dintr-un compartiment în altul, în cadrul unui sistem.	masă × timp^{-1}
	Transport net	Diferenţa dintre două cantităţi transportate în direcţii opuse.	masă × timp^{-1}
	Clearance	Transportul net al unei substanţe dintr-o porţiune a unui sistem A (de obicei singele) în altă porţiune a sistemului (de exemplu urină) exprimată drept volumul din A epurat total de respectiva substanţă, pe unitate de timp.	volum × timp^{-1}
Viteză	Constanta de viteză	Fracţiunea din cantitatea de material aflată într-un sistem compartimental în echilibru dinamic care părăseşte un compartiment dat, în unitate de timp.	timp^{-1}
Timp	Timp de înjumătăţire biologic $T_{(1/2}b)$	Intervalul de timp necesar pentru ca un număr de particule prezent la un moment dat într-un singur compartiment să fie redus la jumătate ca urmare a altor procese decît cele de dezintegrare fizică.	timp
	Timp de înjumătăţire efectiv ($T_{1/2}$ef)	Intervalul de timp necesar pentru ca un număr de nuclee radioactive prezente la un moment dat într-un singur compartiment să fie redus la jumătate ca urmare atît a proceselor fizice cît şi biologice.	timp

1.1.2. CORELAREA BIOCINETICII RADIOFARMACEUTICELOR CU ETAPA DE SEMNIFICAŢIE DIAGNOSTICĂ

Efectele farmacodinamice ale drogurilor utilizate în scop terapeutic sînt fie specifice — cu acţiune pe farmacoreceptori — fie nespecifice [1]. În cazul PRF utilizate pentru explorările de medicină nucleară momentul

Scanned with OKEN Scanner

farmacodinamic este practic inexistent, ceea ce interesează fiind de fapt etapa biocinetică cu semnificaţie diagnostică. H.N.Wagner [6] sistematizează mecanismele de localizare ale PRF clasificîndu-le în transport activ (radioiodul în explorarea tiroidiană), fagocitoză (radiocoloizii de ^{198}Au, ^{99m}Tc, ^{113m}In), sechestrare celulară (eritrocite marcate şi denaturate termic sau chimic folosite în vizualizarea splenică), blocaj capilar (suspensii particulate în perfuzia pulmonară), difuziune simplă şi de schimb (tumori cerebrale), localizare compartimentală (spaţii vasculare tip vizualizare placentară sau a încăperilor cardiace). Clasificarea, cu evidente avantaje didactice nu reuşeşte să integreze PRF într-un concept farmacocinetic unitar. De aceea mai justificată, atît teoretic cît şi practic, ne apare încercarea noastră de a corela biocinetica PRF cu etapa de semnificaţie diagnostică, abordare care ne menţine, pe plan conceptual, în cadrul farmacologiei clinice.

1.1.2.1. Administrarea PRF ca etapă diagnostică. Calea de administrare orală este rareori însoţită de semnificaţie diagnostică, cu excepţia unor aplicaţii reduse în domeniul motilităţii esofagiene şi gastrice. În schimb, administrarea intravenoasă constituie momentul diagnostic esenţial atît în cazul unor investigaţii hemodinamice rezultînd din studiul curbelor de diluţie izotopică (a se vedea cap. 5) cît şi în tehnicile bazate pe mecanismul de blocaj capilar. Cu referire la ultima modalitate de diagnostic şi lărgind noţiunea la cale de administrare intravasculară, utilitatea informaţională a PRF particulate de perfuzie acoperă atît distribuţia topografică capilară în teritoriul aferent vasului respectiv, cît şi evidenţierea unor eventuale şunturi arterio-venoase sau veno-venoase. Administrarea unor PRF pe căle respiratorie constituie însăşi etapa investigaţională în cazul gazelor sau aerosolilor radioactivi (^{133}Xe, ^{99m}Tc-serumalbumină etc.) utilizaţi în explorarea pneumologică. Calea de injectare intratecală, cu distribuire în spaţiul subarahnoidian este elementul primordial în tehnicile de cistenografie izotopică (^{169}Yb—DTPA, ^{111}In—DTPA)

1.1.2.2. Transportul PRF în corelaţie cu etapa de semnificaţie diagnostică. Indiferent de calea de administrare marea majoritate a PRF recunosc şi o etapă de transport sanguin. Fenomenul de legare proteică plasmatică a produselor medicamentoase este binecunoscut în farmacologia clinică [1, 7, 8]. Pentru unele PRF această etapă reprezintă chiar momentul de utilitate diagnostică în timp ce pentru altele este un factor de perturbare. Etapa de transport proteic plasmatic capătă valoare diagnostică pentru explorarea spaţiilor vasculare (cavităţi cardiace, placentă) sau a unor volume de distribuţie (volum plasmatic circulant).

În alte cazuri legarea proteică plasmatică constituie un fenomen nedorit întrucît întîrzie clearance-ul PRF menţinînd nivele de radioactivitate sanguină ridicată, deci un fond tisular crescut. Clearance-ul plasmatic al PRF este unul dintre parametrii biocinetici determinanţi în cazul în care urmărim localizări ale produsului diagnostic în anumite zone topografice sau organe. În acest caz raportul

$$\frac{\text{radioactivitatea organului}}{\text{radioactivitatea tisulară periorgan}}$$

poate constitui un criteriu de apreciere a calităţii PRF; ^{67}Ga-citratul este dezavantajat în diagnostic tocmai de o valoare scăzută a acestui raport

Scanned with OKEN Scanner

(menţinută ca atare de clearance-ul plasmatic lent datorit legării proteice plasmatice), în timp ce alţi PRF (^{99m}Tc-DTPA, ^{131}I-roz bengal) realizează valori crescute ale raportului datorită unei comportări exact opuse (lipsa legării proteice plasmatice, clearance rapid).

Referindu-ne la alte căi de transport menţionăm că preluarea limfatică a unor radiocoloizi constituie etapa diagnostică pentru tehnicile de limfografie izotopică.

1.1.2.3. **Rolul diagnostic al etapei de distribuţie a PRF.** În cazul produselor utilizate pentru explorarea spaţiilor de distribuţie (^{24}NaCl — pentru volum extracelular, $^{3}H_2O$ pentru apa totală din organism etc.) unde prin definiţie există o perfectă suprapunere între noţiunea de trasor şi cea de PRF, rolul diagnostic al acestei etape biocinetice este, de la sine, evident.

Referindu-ne la alte PRF o pondere importantă în cadrul mecanismelor de localizare o joacă factorii de transfer şi distribuţie cum sînt : dimensiunile şi forma moleculelor, liposolubilitatea, mecanismele de transport celular specific [9].

Ilustrativ pentru importanţa dimensiunilor şi formei moleculelor este mecanismul de localizare miocardică a ^{201}Tl a cărui bioanalogie cu potasiul pare a fi fundamentată tocmai pe aceşti determinanţi. Alteori, modificările patologice ale permeabilităţii fac ca PRF cu molecule de dimensiuni şi formă dată să realizeze totuşi diferenţe între transportul net în ţesutul afectat faţă de cel normal (acumularea $^{99m}TcO_4^-$ în tumorile cerebrale).

Liposolubilitatea este factor radiofarmaceutic determinant atît în transferul prin membranele celulare cît şi în fundamentarea explorării diferenţiate a irigaţiei unor organe ce cuprind ţesuturi cu conţinut lipidic diferit (^{133}xenonul în determinarea debitului sanguin al substanţei cerebrale cenuşii şi albe).

Mecanismele de transport specific constituie modalitatea ideală de localizare a PRF, implicit de etapă cu semnificaţie diagnostică. Din păcate dispunem încă de un număr redus de situaţii în care transferurile metabolice specifice unor anumite organe sau procese fiziopatologice particulare găsesc echivalenţe în PRF diagnostice (radioiodura în investigarea tiroidiană, radiocoloizi pentru sistemul reticulo-histiocitar, polifosfaţi marcaţi cu techneţiu pentru procese de osteogeneză reactivă).

1.1.2.4. **Eliminarea PRF ca etapă cu utilitate investigaţională.** Conferirea calităţii diagnostice de etapa eliminării este caracteristică pentru agenţii nefrotropi şi colefili. Aceste PRF trebuie să posede o stabilitate chimică *in vivo* remarcabilă, forma eliminată fiind necesar a fi identică cu cea administrată; păstrarea integrităţii lor condiţionează adesea corectitudinea actului diagnostic. Alte căi de eliminare care constituie în acelaşi timp etape cu semnificaţie de explorare sînt calea respiratorie (pentru gazele radioactive inerte injectate intravenos) şi calea salivară (folosind la vizualizarea glandelor parotide cu $^{99m}TcO_4^-$).

Pe de altă parte, etapa de eliminare a PRF poate constitui uneori un element de perturbare în actul diagnostic, prin „ecranări radioactive" ale unor zone aflate în aria de interes a medicului (PRF osteotrope marcate cu ^{99m}Tc acumulate în vezica urinară „ecranează" parţial sacrul; excreţia gastrică a $^{99m}TcO_4^-$ liber interferează vizualizarea renală stîngă).

Corelarea biocineticii PRF cu momentul de semnificaţie diagnostică este determinantă pentru elaborarea raţională a metodologiei de explorare paraclinică. Etapa de utilitate diagnostică se suprapune cel mai adesea intervalului de timp şi condiţiilor create atunci cînd comportarea PRF la nivelul compartimentului explorat capătă semnificaţie medicală optimă prin diferenţierea de compartimentele ce nu intervin sau eventual chiar perturbă actul diagnostic.

1.2. CRITERIILE PRODUSULUI RADIOFARMACEUTIC OPTIM

PRF optim ar trebui să îndeplinească cumulativ o serie de calităţi impuse de criterii radionuclidice şi tehnologico-diagnostice, farmacocinetice, radiobiologice, precum şi economico-organizatorice [8, 9, 10, 11, 12, 13].

1.2.1. CRITERII RADIONUCLIDICE ŞI DE TEHNOLOGIE DIAGNOSTICĂ

Radionuclizii folosiţi pentru marcarea PRF trebuie să satisfacă următoarele condiţii:

a) emisie de radiaţii gamma sau X detectabile la exteriorul organismului; b) energie fotonică adecvată (valoarea optimă 200 keV, limite 100—300 keV) pentru a se realiza atît penetraţia tisulară necesară detecţiei externe cît şi compatibilitatea cu actualele mijloace tehnice de detecţie, măsurare sau vizualizare; c) $T_{1/2}$ fizic scurt, totuşi suficient pentru prepararea, purificarea, livrarea PRF ca şi pentru efectuarea actului diagnostic; d) absenţa sau un minim de radiaţie corpusculară beta, Auger, electroni de conversie, ca şi a fotonilor de joasă energie rezultînd din captare electronică sau conversie internă (excepţie PRF marcate cu emiţători de pozitroni); e) raport de merit al radiaţiei gamma reprezentat prin

$$\frac{\text{semnale gamma utilizabile diagnostic}}{\text{energie inutil absorbită local}}$$

cu valoare maximă [10, 11].

În diagnosticul radioizotopic energia fotonilor constituie un factor critic atît pentru aprecierea profunzimii leziunilor detectabile, pentru evaluarea rezoluţiei spaţiale posibil a fi atinse cît mai ales pentru alegerea aparaturii adecvate (tabela 1.2). Energia gamma a radionuclidului utilizat prezintă deosebit interes pentru explorările în care se utilizează simultan două PRF, caz în care tandemul energetic trebuie să permită separarea spectrometrică a cuantelor caracteristice fiecărui trasor. Asemenea cupluri sînt $^{125}I—^{131}I$, $^{51}Cr—^{59}Fe$, $^{99m}Tc—^{113m}In$, care ataşaţi unor molecule cu farmacocinetică diferită permit efectuarea simultană a unor explorări funcţionale sau morfologice complexe şi complementare.

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 1.2

Corelarea caracteristicilor aparaturii electronice de medicină nucleară cu cele ale radionuclizilor utilizaţi pentru marcarea produselor radiofarmaceutice *

Nr. crt.	Denumirea aparatului	Domeniu de lucru gama energetic (keV)	Discriminare energetică	Rezoluţie spaţială intrinsecă	Radionuclizi utilizaţi în condiţii	
					optime	mediocre
1	Scintigraf liniar	20—500	bună	limitată numai de colimare	^{67}Ga, ^{75}Se, ^{87m}Sr, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{169}Yb	^{18}F, ^{113m}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{197}Hg, ^{198}Au,
2	Cameră de scintilaţie Anger	optim 100—200 posibil 70—400	bună	aprox. 7 mm la 150 KeV	^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In, ^{127}Xe	^{75}Se, ^{113m}In, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{197}Hg, ^{198}Au
3	Cameră de pozitroni	510	bună	aprox. 10 mm	^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{52}Fe	—
4	Cameră tip Kellershonn (Spark chamber)	30—80	absentă	aprox. 2—3 mm	^{125}I	^{197}Hg
5	Detector cu cristal de scintilaţie tip puţ	20—1000	mediocră	nu este cazul	^{57}Co, ^{75}Se, ^{125}I, ^{131}I	^{22}Na, ^{24}Na, ^{42}K, ^{51}Cr, ^{59}Fe

* Surse bibliografice: J.G. McAfee [9], V.R. Mc Cready [12], R. Adams [13].

Scanned with OKEN Scanner

1.2.2. CRITERII RADIOFARMACOCINETICE

Găsirea PRF cu tropism specific şi exclusiv pentru un anumit compartiment (în nomenclatura trasorilor) respectiv ţesut, organ, funcţie sau proces patologic (în terminologie medicală), reprezintă un deziderat primordial în cercetarea de medicină nucleară. Dispunem de foarte puţine PRF corespunzînd întrutotul acestui deziderat, iar localizările neadecvate pot avea atît caracter „fals pozitiv" (prezenţa concentrării diferenţiate într-un compartiment nespecific pentru respectivul PRF) cît şi caracter „fals negativ" (absenţa concentrării diferenţiate într-un compartiment specific pentru respectivul PRF).

În medicina nucleară sînt preferate PRF care se acumulează în zonele de interes diagnostic (tropism selectiv pozitiv) faţă de cele a căror semnificaţie diagnostică este conferită de absenţa sau diminuarea fixării în respectivele regiuni (tropism negativ). Unul dintre parametrii de calitate biocinetică a PRF în tehnicile de vizualizare este „cifra de merit", care apreciază diferenţa statistică dintre radioactivitatea zonei de interes diagnostic şi cea a regiunilor înconjurătoare; cel mai adesea „cifra de merit" rezultă din corelarea vitezei de acumulare a PRF în zona„ ţintă" cu valorile clearance-ului plasmatic al respectivul produs. În ceea ce priveşte dinamica biologică a proceselor de fixare sau epurare a PRF la nivelul zonei de interes diagnostic, se apreciază că $T_{1/2}$ ef. optim trebuie să fie aproximativ egal cu durata perioadei de observaţie [9].

1.2.3. CRITERII RADIOBIOLOGICE

Calculul dozelor de iradiere internă produsă de PRF este discutat în alt capitol al acestei lucrări. Pe plan medical şi radiobiologic acceptăm aprioric principiul că iradierea bolnavului trebuie păstrată cît mai redusă şi că PRF au indicaţie de utilizare atunci cînd o informaţie diagnostică de aceeaşi semnificaţie clinică nu poate fi obţinută printr-o altă explorare paraclinică neiradiativă. În aprecierea globală a calităţii unui PRF este esenţială cunoaşterea iradierii interne produse la nivelul organului critic, al gonadelor, sistemului hematopoetic ca şi doza primită de întregul corp. Iradierea minimă ca atribut al PRF ideal rezultă în principal din absenţa emisiunii corpusculare şi $T_{1/2}$ fizic sau $T_{1/2}$ efectiv scurt; radionuclizii cu $T_{1/2}$ fizic lung chiar în condiţiile unui $T_{1/2}$ efectiv adecvat ridică totuşi în practică probleme suplimentare de protecţie a mediului ambiant.

Criteriul radiobiologic „stigmatizează" o serie de PRF printre care se numără ^{131}INa, ^{131}I-macroagregatele de serumalbumină umană, ^{85}Sr-nitratul, ^{203}Hg-clormerodrinul; ultimele două produse nu mai sînt acceptate de Ministerul Sănătăţii din ţara noastră pentru utilizare diagnostică clinică, tocmai datorită iradierii excesive pe care o produc [14].

1.2.4. CRITERII ECONOMICO-ORGANIZATORICE

Considerînd îndeplinite celelalte criterii ale PRF optim, aria de utilizare practică a acestuia va fi determinată, în ultimă instanţă, de elementele economico-organizatorice. Între acestea includem costul PRF/

Scanned with OKEN Scanner

investigaţie, capacitatea de a dispune de produs atunci cînd este necesar (procurabilitate, relaţia $T_{1/2}$ fizic — durata transportului, posibilităţi de stocare, perisabilitate etc.) concordanţa caracteristicilor PRF cu dotarea existentă în laborator precum şi competenţa cadrelor de a valorifica produsul prin prescripţii diagnostice adecvate.

Considerente economico-organizatorice, la care se alătură satisfacerea celorlalte criterii enunţate în acest capitol, fac ca în prezent ^{99m}Tc să fie considerat drept radionuclidul optim pentru marcarea unor PRF de largă utilizare diagnostică.

1.3. REACŢII ADVERSE ŞI EFECTE SECUNDARE DUPĂ UTILIZAREA DIAGNOSTICĂ A PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

În medicina contemporană se manifestă o preocupare crescîndă pentru problemele de farmacovigilenţă, uzul şi mai ales abuzul de medicamente ducînd la apariţia unei noi patologii. Aspectele de farmacovigilenţă în domeniul PRF capătă de asemenea o identitate proprie axată fie pe efectele secundare decurgînd din caracterul iradiativ al acestor compuşi, fie pe reacţii adverse decurgînd din caracterul lor de produs farmaceutic.

1.3.1. EFECTE SECUNDARE DECURGÎND DIN CARACTERUL IRADIATIV AL PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE

Pentru majoritatea PRF, iradierea produsă prin activităţile administrate în scop diagnostic este considerată drept lipsită de efecte somatice sau genetice. Acest concept, valabil pentru adulţi şi luînd în considerare o singură administrare diagnostică impune însă corecţii legate de vîrstele tinere sau repetări frecvente ale investigaţiilor iradiative. Administrarea PRF la bolnavi sub vîrsta de 18 ani este, în general, contraindicată utilizarea lor fiind permisă numai în cazurile în care beneficiul diagnostic este net superior riscului radiobiologic. La adulţi, un risc radiobiologic crescut — în general neglijat în practica medicală — apare în cazul repetării frecvente a investigaţiilor cu PRF; o serie de bolnavi cu afecţiuni cronice al căror stadiu evolutiv poate fi obiectivizat prin metode radioizotopice (la noi în ţară cazul hepatitelor cronice postvirotice sau al guşilor endemice) sînt uneori investigaţi repetat şi la intervale scurte, situaţie în care negarea posibilelor riscuri radiobiologice este greu de susţinut [15].

Pe plan iradiativ sînt cunoscute în medicina nucleară incidente sau chiar accidente grave decurgînd din erori de administrare; cel mai dramatic este cazul publicat de J.M. Baron şi colab. [16] la care administrîndu-se intravenos, pentru efectuarea unei scintigrafii hepatice, *200 milicurie* de ^{198}Au coloidal în loc de *200 microcurie* evoluţia a fost letală.

Problemele de iradiere în mediul spitalicesc sau familiar ca şi cele de contaminare a mediului ambiant prin excrete, deşi posibile, au importanţă redusă în cazul administrărilor diagnostice de PRF; evitarea acestor posibile efecte secundare este riguros legiferată la noi în ţară [17].

Întrucît o serie de PRF sînt excretate prin lapte (^{67}Ga-citrat, ^{131}I-ortoiodohipuratul, radionuclizii de marcare a macroagregatelor de serum-albumină) se recomandă întreruperea alăptării de către mamele la care s-a impus drept obligatorie efectuarea de explorări radioizotopice *in vivo* [18].

1.3.2. EFECTE SECUNDARE DECURGÎND DIN CARACTERUL DE PRODUS FARMACEUTIC

Deosebim reacţii adverse comune unor grupe largi de PRF şi efecte secundare specifice unor grupe particulare de PRF.

1.3.2.1. Reacţii adverse comune unor grupe largi de produse radiofarmaceutice. În acest cadru se înscriu reacţiile pirogene, alergice şi de tip vegetativ.

a) Reacţiile pirogene apar în special după administrarea PRF pe cale intravenoasă şi constau în frisoane, creşterea temperaturii organismului, stare de rău general ca şi alte semne clinice mai puţin caracteristice (teamă, paloare, senzaţie de apăsare sternală etc.). Simptomul caracteristic, reacţia febrilă, apare la 20—30 minute de la injectarea intravenoasă şi atinge maximul de intensitate după 1—3 ore; tratamentul prompt şi adecvat atenuează şi scurtează reacţia pirogenă. În general, evoluţia spontană a acestui incident este benignă, dar la bolnavi cu stare generală alterată ca şi la cei cu afecţiuni cardiorespiratorii severe apariţia unei reacţii pirogene poate precipita complicaţii grave.

Natura substanţelor ce produc reacţia febrilă este foarte variată incluzînd produşi termostabili ce rezultă din metabolismul bacteriilor, virusilor, fungilor ca şi emulsii lipidice şi compuşi de degradare proteică [19].

b) Reacţii alergice, mergînd de la eriteme trecătoare pînă la şoc anafilactic au fost descrise şi după administrarea de PRF. Componentele incriminate cel mai adesea sînt stabilizatorii soluţiilor coloidale, în particular dextranul [20, 21] sau gelatina [22] şi mult mai rar PRF conţinînd serumalbumină sub formă de macroagregate sau microsfere [23]. Deş puţin frecvente în cazul PRF, posibilitatea apariţiei accidentelor alergice nu trebuie niciodată total exclusă; de aici decurge obligaţia ca în trusa de urgenţă a fiecărui laborator de medicină nucleară să existe în permanenţă medicaţia necesară tratamentului acestui tip de reacţie adversă.

c) Reacţiile de tip vegetativ — survin în general la subiecţii cu labilitate neuro-vegetativă, sînt cel mai adesea de tip vagal şi nu sînt corelate cu PRF utilizat. Prevenirea lor se face efectuînd injectarea bolnavului în clinostatism.

1.3.2.2. Efecte secundare specifice unor grupe particulare de PRF. Aceste efecte sînt de două tipuri:

a) Reacţii iritative locale, de tipul meningitelor, apar după administrarea intra-tecală a PRF utilizate în cisternografia izotopică [24]. Pentru ^{131}I-serumalbumină incidenţa acestei reacţii adverse este apreciată la 10—14% [25] în timp ce pentru alte produse (^{169}Yb—DTPA, ^{111}In—DTPA) procentul este mai scăzut. Din punct de vedere clinic avem de-a

Scanned with OKEN Scanner

face cu meningite aseptice, forme medii, care însă evoluează rapid spre vindecare spontană, fără sechele. Printre factorii etiologici incriminați citățm cantitatea de albumină, produși de iritație chimică, procese de sensibilizare și prezența de endotoxine (26, 27].

b) Modificările hemodinamice din teritoriul circulației mici ce apar după administrarea intravenoasă a PRF particulate de perfuzie sînt printre cele mai cunoscute reacții secundare din medicina nucleară. Detalierea lor este făcută în capitolul respectiv (4.1.4); subliniem însă încă odată și aici că incidența ridicată a accidentelor după unele PRF de acest tip (îndeosebi macroagregatele de fier-hidroxid) a făcut ca ele să fie retrase de pe lista produșilor diagnostici utilizați în practica medicală [28].

c) Transmiterea hepatitei virale este posibilă în cazul PRF ce conțin derivați de sînge uman (serumalbumină și fibrinogen). Controlul riguros al donatorilor de sînge și al produselor biologice prin decelarea radioimunometrică a antigenului Australia scade semnificativ riscul de contagiune [29].

Concluzionînd, putem aprecia că PRF produc un număr redus de reacții adverse și efecte secundare dar că acestea sînt posibile și trebuie cunoscute. Preocuparea pentru o politică organizată de farmacovigilență în domeniul produselor radiofarmaceutice apare tot mai des în literatura de specialitate [28, 30, 31, 32, 33].

BIBLIOGRAFIE

1. V. Stroescu, „Farmacologie clinică", ed. a II-a, Edit. medicală, București, 1977.
2. G.L. Brownell, M. Berman, J. Robertson, Nomenclature for tracer kinetics, *J.A.R.I.* **19**, 249 (1968).
3. N. Veall, în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", p. 3, IAEA, Vienna, 1971
4. C.W. Sheppard, „Basic principles of the tracer method", Wiley, New York, 1962.
5. A. Rescigno, G. Segre, „Drug and tracer kinetics", Blaisdell, Waltham, 1966.
6. H.N. Wagner, *Radiology*, **86**, 601 (1966).
7. R. Olinescu, „Aspecte de farmacocinetică", în V. Voicu, R. Olinescu, „Mecanisme enzimatice în farmacodinamie" Edit. științifică și enciclopedică, București, 1977.
8. D. Dobrescu, „Farmacodinamie", ed. a II-a, Edit. didactică și pedagogică, București 1977.
9. J.G. Mc Afee, G. Subramanian, „Radioactive agents for imaging", cap. 2, p. 13, în „Clinical Scintilation Imaging", Grune and Stratton, New York, 1975.
10. W.G. Myers, Radioisotopes of iodine, în „Radioactive Pharmaceuticals", USAEC, 1966,
11. R.N. Beck, „Some essential characteristics of radioactive materials" în „Diagnostic Nuclear Medicine", Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1976.
12. V.R. Mc Cready, N.G. Trott, „Tumor-localizing pharmaceuticals", în „Tumor localization with radioactive agents", p. 1, IAEA, Vienna, 1976.
13. R. Adams, „Instruments for in vivo counting and imaging", cap. 5. p. 95, în „Radiopharmacy", J. Wiley and Sons Inc., New York, 1976.
14. * * * MINISTERUL SĂNĂTĂȚII — 1978, „Nomenclatorul produselor radiofarmaceutice aprobate pentru utilizare în laboratoarele de medicină nucleară".
15. E.L. Senger, W. Stumpe, „The future of radioisotopes in medicine: benefits vs. risks", în „Medical radionuclides: radiation dose and effects", USAEC, Oak Ridge, 1970.
16. J.M. Baron, S. Yachnin și colab., în „Handling of radiation accidents", IAEA, Vienna, 1969.

14 — c.1 37

Scanned with OKEN Scanner

17. * * * COMITETUL DE STAT PENTRU ENERGIE NUCLEARĂ, „Norme republicane de securitate nucleară", 1976. Regimul de lucru cu surse de radiații nucleare" capitolul IV.
18. P.O. Anderson, *Drug Intel. Clin. Pharm.*, **11**, 208 (1977).
19. W.H. Briner, „Quality control, pyrogen testing and sterilization of radioactive pharmaceuticals", în „Radioactive pharmaceutical" USAEC, Oak Ridge, 1966.
20. E. Michelson, *N. Engl. J. Med.*, **278**, 552 (1968).
21. W.W. Hunter, *J. Nucl. Med.*, **10**, 607 (1969).
22. M.B. Block, J.S. Thompson, R.E. Polcyn, *Amer. J. Dig. Dis.*, **15**, 569 (1970).
23. R.L. Littenberg, *J. Nucl. Med.*, **16**, 236 (1975).
24. R.K. Oldham, E.V. Staab, *Radiology* **97**, 317 (1970).
25. B. Barnes, M. Fish, *Neurology*, **22**, 83 (1972).
26. B. Messert, M.J. Rieder, *Neurology*, **22**, 789 (1972).
27. J.F. Cooper, J.H. Herbert, *J. Nucl. Med.*, **16**, 809 (1975).
28. E.S. Williams, *Br. J. Radiol*,. **47**, 54 (1974).
29. A. Mogoș, J. Zaharescu, Gh. Georgescu, *Radiologia*, **26**, 67 (1977).
30. H.L. Atkins, W. Hauser și colab., *J. Nucl. Med.*, **13**, 232 (1972).
31. * * * SNM NEWSLINE (1977) vol. 2, nr. 2, p. 19.
32. L. Ford, A. Shroff și colab., *J. Nucl. Med.*, **19**, 116 (1978).
33. H.L. Atkins, „Adverse reaction" în „Quality control in nuclear medicine" C.V. Mosby Company, Saint Louis 1977.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

RADIOFARMACEUTICE CU LOCALIZARE SELECTIVĂ TUMORALĂ

(^{67}Galiu-citratul și radiobleomicinele)

Problema PRF cu localizare selectivă tumorală a fost și rămîne o preocupare prioritară a medicinii nucleare. Din multitudinea PRF testați în acest domeniu, recentele treceri în revistă sau analize critice de ansamblu [1, 2, 3, 4, 5] permit să selecționăm drept produse pentru vizualizare tumorală, de certă actualitate diagnostică, ^{67}Ga-citratul și radiobleomicinele.

2.1. ^{67}GALIU-CITRATUL

Radioizotopii galiului, aflați între produsele cu potențială utilizare medicală încă din anul 1949 [6] s-au situat mult timp pe un loc periferic în ierarhia PRF datorită polarizării preocupărilor numai pe posibila lor folosire drept agenți de vizualizare osoasă. După ce Edwards și Hayes [7] descriu în 1969 proprietățile oncotrope ale ^{67}Ga-citratului se înregistrează o creștere bruscă a interesului pentru acest produs, în care se spera a se găsi un agent adecvat pentru detecția scintigrafică a tumorilor maligne. Cercetările publicate, în majoritate cu caracter clinico-diagnostic, stabilesc indicațiile și limitele acestui radiofarmaceutic atît în diagnosticul oncologic cît și — prin nespecificitatea sa — în localizarea unor procese inflamatorii.

2.1.1. ELEMENTE DE FARMACOCINETICĂ

2.1.1.1. **Clearance plasmatic.** După administrare intravenoasă, dispariția din sînge a ^{67}Ga-citratului este relativ lentă. La șobolani curba epurării plasmatice prezintă aspect biexponențial, cu timpii de înjumătățire de 7 ore și respectiv 6,5 zile [8]. La om se apreciază $T_{1/2}$ al epurării plasmatice la aproximativ 12 ore [5]. Dispariția lentă din sînge a PRF este explicată prin afinitatea pentru proteinele plasmatice ; aproximativ 30 % din activitatea sanguină a ^{67}Ga este legată de proteine, în principal de transferină și heptoglobină. Legarea de serine este mai slabă și mai redusă [9]. Epurarea plasmatică lentă a ^{67}Ga-citratului constituie una din servituțile farmacocinetice ale produsului, determinînd un fond tisular crescut prelungit.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.1.2. **Excreţie.** Eliminarea ^{67}Ga-citratului din organism se face predominant pe cale urinară şi digestivă. În cercetări experimentale la rozătoare mici excreţia în primele 24 ore totalizează circa 30% din doză; aproximativ o treime reprezintă eliminarea urinară iar restul eliminarea digestivă [10].

La om, determinările radioantropometrice indică o eliminare biexponenţială din organism; componenta rapidă, cu $T_{1/2}$ biologic de 30 ore corespunde la 17% din activitatea administrată, iar componenta lentă, cu $T_{1/2}$ biologic de 613 $\pm$ 83 ore răspunde de eliminarea a 83 $\pm$ 11% din activitate [11]. Calea digestivă este responsabilă de excreţia a aproximativ 10% din doză; eliminarea digestivă se repercută negativ asupra meritelor scintigrafice ale produsului, interferînd vizualizarea organelor abdominale.

2.1.1.3. **Distribuţie în organism.** Datele experimentale obţinute pe şobolan demonstrează că în cazul ^{67}Ga-citratului fără purtător cea mai mare parte din radioactivitatea injectată este distribuită între schelet, ficat, splină şi tract gastro-intestinal. Dinamica distribuţiei pe organe (fig. 2.1) înregistrează creşterea treptată a radioactivităţii hepatice şi menţinerea aproape constantă, la un nivel destul de ridicat a radioactivităţii gastro-intestinale [12].

În cazul injectării ^{67}Ga-citratului cu purtător creşte ponderea fixării scheletice a ^{67}Ga, mărirea procentului de radioactivitate osoasă fiind direct proporţională cu creşterea cantităţii de galiu stabil administrat.

Lactaţia reprezintă un alt factor care modifică biodistribuţia radiogaliului în organism. Ţesutul mamar al animalelor ce alăptează acumulează ^{67}Ga în concentraţii de 4—20 ori mai mari decît la animalele martore; conţinutul de ^{67}Ga în scheletul animalelor ce alăptează este mai scăzut, sugerînd existenţa în acest caz a unui efect de decorporare produs prin lactaţie [1,8].

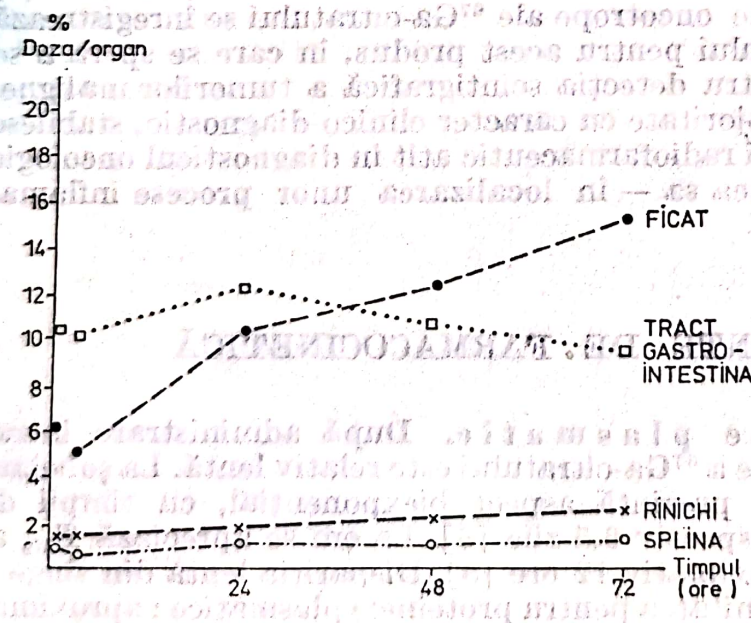


Fig. 2.1. — Dinamica distribuţiei în unele organe a ^{67}Ga-citratului administrat intravenos la şoarece; după datele lui Saha şi Farrer [12].

La om, concentraţia ^{67}Ga în diferite ţesuturi (% din activitatea administrată/kg corp) este de 0,4 — 10 pentru splină, 0,6 — 5,2 pentru ficat, 0,6 — 6,2 pentru rinichi, 0,04 — 9,2 pentru os, ceea ce corespunde la procente medii din activitatea administrată/organ de respectiv 1%, 5%, 2% şi 24% [11]. Se remarcă o evidentă lipsă de uniformitate în distribu-

Scanned with OKEN Scanner

ția ^{67}Ga-citratului în organe : rinichiul concentrează predominant cortical, splina în celule reticulare, ficatul atît în celulele Kupffer cît și în hepatocite [13].

Cunoașterea distribuției normale a ^{67}Ga-citratului în organismul uman este esențială pentru interpretarea corectă a scintigrafiilor efectuate în scop diagnostic [14, 15].

Tabela 2.1 notează un mod convențional cu cifra 100 concentrația de ^{67}Ga întîlnită la nivelul ficatului pe imaginea scintigrafică normală și gradează în consecință intensitatea fixării normale la nivelul altor organe sau sisteme [16].

TABELA 2.1

Intensitatea acumulării ^{67}Ga-citratului pe scintigrafia normală de întreg corp — modificat după Machida și colab. [16]

Ficat	100
Rinofarinx	50
Mediastin	49,5
Gl. tiroidă	47
Splină	45,5
Vertebre lombare	41,5
Rect	40
Colon descendent	37
Glande salivare	34,5
Colon ascendent	31,5
Colon transvers	28,5
Articulația scapulo-humerală	26,5

Uneori, în mod normal, se remarcă o acumulare a ^{67}Ga-citratului la nivelul glandelor mamare ; această acumulare este crescută de stimulii fiziologici ai receptorului mamar : menstră, estrogeni, sarcină și alăptare. ^{67}Ga este excretat prin lapte în cantități apreciabile [13, 17].

2.1.2. FIXAREA TUMORALĂ A RADIOGALIULUI

După lucrarea princeps [7] semnalînd oncotropismul radiogaliului, o serie de cercetări experimentale au confirmat afinitatea crescută a produsului pentru țesutul tumoral [8, 15, 18, 19].

TABELA 2.2

Acumularea ^{67}Ga-citratului în tumori experimentale

Tipul tumorii	Animal	Concentrația în tumoră	Raport $\frac{\text{tumoră}}{\text{sînge}}$	Bibliografie
Hepatom Morris 5123C	șobolan	10 ± 0,8 (a)	66	HAYES [1]
Limfosarcom p 1798	șoarece	5,6 ± 0,4 (a)	6,5	HAYES [1]
Limfosarcom Gardner	șoarece	5,2 ± 0,6 (a)	3,7	HAMMERSLEY [18]
Carcinom hepatic	șobolan	2,1 ± 0,5 (b)	—	BUENO [15]
Sarcom Yoshida	șobolan	1,8 (a)	0,8	ANDO [19]
Fibrosarcom BICR/A2	șobolan	1,1 ± 0,19 (a)	2,1	HAMMERSLEY [18]

a — Acumulare determinată la 24 h de la injectare ; b — intervalul de timp al acumulării neprecizat.

Tabela 2.2. sintetizează rezultatele unor asemenea cercetări ; se remarcă tropismul pentru anumite tipuri de tumori experimentale (hepatom, limfosarcom) în care se realizează concentrații ridicate ale PRF cu raport $\frac{\text{tumoră}}{\text{sînge}}$ mult supraunitar. Acumularea ^{67}Ga-citratului pe tumorile experi-

Scanned with OKEN Scanner

mentale variază foarte mult de la un tip la altul de tumoră ; de asemenea, nu se întîlneşte o reproductibilitate a concentraţiilor nici atunci cînd tumorile provin din acelaşi organ [1]. Există însă un acord general în cercetarea experimentală asupra faptului că ^{67}Ga-citratul se fixează pe ţesutul tumoral viabil şi nu pe cel necrotic [4].

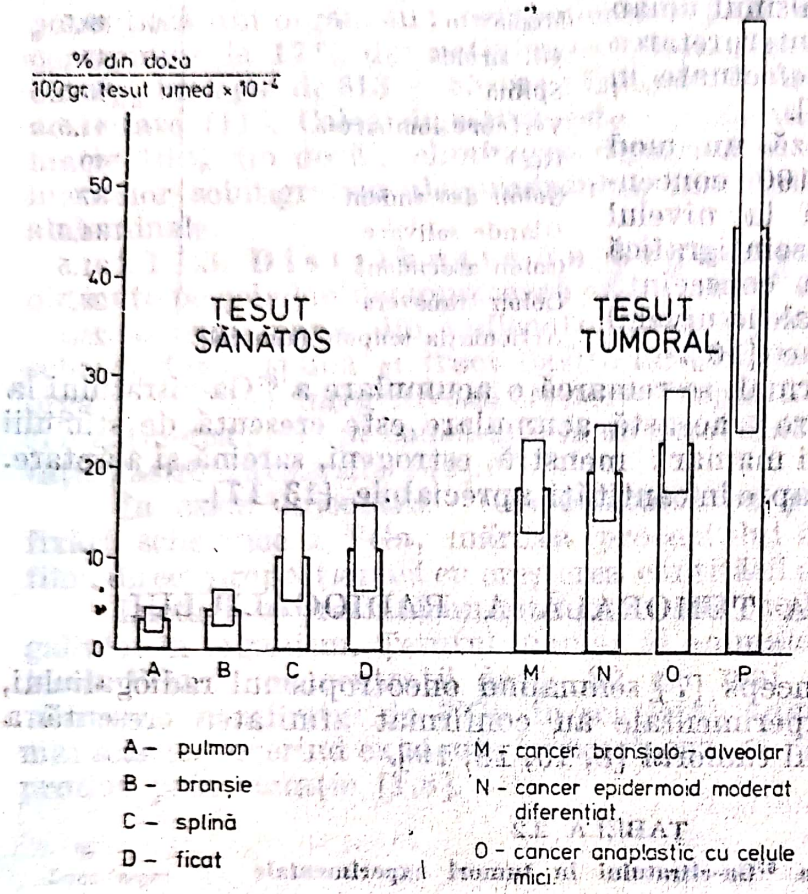


Fig. 2.2. — Concentraţia ^{67}Ga-citratului în ţesuturi umane sănătoase (A—D) şi tumorale (M—P).

Cercetările privind oncotropismul ^{67}Ga la om confirmă variaţiile acumulării PRF, funcţie de tipul ţesutului tumoral. Graficul 2.2 evidenţiază clar diferenţele de concentraţie a ^{67}Ga-citratului în probe de ţesut uman sănătos sau tumoral [20]. Largi serii de cercetări clinico-diagnostice atestă acumularea preferenţială a ^{67}Ga-citratului pe anumite tipuri histologice de tumori maligne [13]. Procentul localizărilor pozitive este de 70—80 % pentru boala Hodgkin, dar evident mai scăzut în limfoamele nehodgkiniene [21, 22]. Procente importante de localizări pozitive (84 %) se întîlnesc în cancerele pulmonare [23], precum şi în tumorile primitive, hepatice şi osoase [13, 20]. În alte forme histopatologice de tumori maligne probabilitatea vizualizării prin ^{67}Ga-citrat este mai redusă (procente pozitive de 57 % în cancerul mamar, 43 % în cancerele gastro-intestinale, 39 % în cele uterine).

Ţinînd seama de caracteristicile farmacocinetice ale ^{67}Ga-citratului se încearcă creşterea procentului de vizualizare diagnostică prin ameliorarea raportului activitate tumoră/activitate sanguină, ca şi prin diminuarea efectului perturbator reprezentat de eliminarea digestivă. Administrarea simultană a unor cantităţi reduse de scandiu produce o

eliminare mai rapidă a ^{67}Ga din ţesuturile moi, fără a afecta însă acumularea PRF de către ţesutul tumoral [1]. Efecte similare s-au obţinut şi cu fier-dextran [24]. Aceste artificii farmacocinetice care ar putea facilita vizualizarea tumorală datorită creşterii raportului radioactivitate tumoră/radioactivitate ţesuturi moi se explică prin deplasarea ^{67}Ga-citratului de pe proteinele plasmatice şi eliminarea sa mai rapidă, ca urmare a competiţiei exercitate de scandiu sau fier-dextran. Încercările de a scădea efectul perturbator al eliminării intestinale a ^{67}Ga prin administrarea orală de agenţi chelatici care să-i grăbească evacuarea au eşuat datorită acţiunilor secundare exercitate pe biocinetica radiofarmaceuticului ce se soldează cu scăderea acumulării acestuia în zonele de interes diagnostic [25].

De importanţă pentru practica diagnostică se dovedeşte relaţia existentă între viabilitatea ţesutului tumoral şi intensitatea acumulării radiogaliului. Este un fapt bine stabilit că tumorile necrotice sau fibroase acumulează ^{67}Ga-citratul în proporţie mai redusă decît cele viabile [10, 13]. Acest fapt se corelează cu constatările care demonstrează că chimioterapia sau radioterapia antitumorală produc uneori o scădere a acumulării ^{67}Ga-citratului la nivelul formaţiunii maligne. Urmărind în timpul tratamentului modificările de acumulare a radiofarmaceuticului devine posibilă atît aprecierea sensibilităţii tumorii la agentul terapeutic folosit cît şi obţinerea unor date suplimentare necesare elaborării prognosticului [13, 20, 26].

2.1.3. MECANISMUL ACUMULĂRII TUMORALE A ^{67}Ga-CITRATULUI

Mecanismul concentrării ^{67}Ga-citratului în unele tumori maligne este încă puţin cunoscut.

O serie de investigaţii s-au dirijat către stabilirea topografiei celulare a ^{67}Ga acumulat în tumori.

Cercetări autoradiografice au demonstrat că aproximativ 70% din trasor rămîne localizat citoplasmatic, concentrîndu-se în structuri asemănătoare lizozomilor. Hayes şi colab. [1] au denumit aceste formaţiuni „GBG" (gallium binding granules). Din punct de vedere biochimic ^{67}Ga intracelular este legat de macromolecule proteice, a căror activitate enzimatică include fosfataza acidă [13]. Alte cercetări [9] confirmă că distribuţia activităţii ^{67}Ga la nivel subcelular este paralelă cu cea a fosfatazei acide lisosomiale şi cu a β-glucuronidazei.

Acumularea tumorală a ^{67}Ga-citratului pare a fi nespecifică şi pasivă [11]. Deşi mecanismul concentrării este necunoscut, au fost sugerate o serie de ipoteze dintre care reţinem trei grupe de explicaţii.

1) Intervenţia legării de proteine. Deşi afinitatea ^{67}Ga-citratului pentru proteinele plasmatice este puternică, acest mecanism general de localizare tumorală a fost infirmat în cazul galiului [19].

Se pare că ar fi însă posibilă intervenţia unui mecanism de legare proteică intracelulară. Winchell şi colab. [27] susţin că datorită glicolizei anaerobe a ţesutului tumoral şi scăderii pH-ului intracelular Ga-citratul este disociat iar Ga ionic rezultat formează cu proteinele citoplasmatice un Ga-proteinat. Această ipoteză poate fi acordată cu existenţa unei componente de legare unică şi puternică prezentă în ţesutul tumoral, denumită generic „GBG", în fapt o glicoproteină cu greutate

Scanned with OKEN Scanner

moleculară de $4,5 \times 10^5$ daltoni, sensibilă la căldură şi variaţii de pH [28].

2) Plecîndu-se de la rezultatele experimentale ce atestă fixarea mai intensă a ^{67}Ga în ţesuturile viabile comparativ, cu cele necrotice, ca şi acumularea preferenţială în tumorile aflate în faza de creştere rapidă s-a corelat oncotropismul radiogaliului cu rata de proliferare tumorală [29]. Atît studiul paralel al încorporării ^{67}Ga-citratului şi sintezei DNA în tumori cît şi verificările efectuate pe modele experimentale de proliferare celulară rapidă (ficatul de şoarece în regenerare după hepatectomie parţială) nu aduc elemente care să confirme în totalitate această ipoteză [18, 30].

3) Higashi şi colab. [31] explică acumularea ^{67}Ga prin permeabilitatea crescută a membranelor celulare tumorale comparativ cu cea a celulelor normale. În această optică se pot încadra şi datele care sugerează că celulele în proliferare tumorală activă pot prezenta modificări de membrană care se soldează cu creşterea transportului intracelular al ^{67}galiului [18, 30].

În pofida unei utilizări practice relativ largi mecanismul acumulării tumorale a ^{67}Ga-citratului nu este încă elucidat [28].

2.1.4. ACUMULAREA RADIOGALIULUI LA NIVELUL PROCESELOR INFLAMATORII

Acumularea ^{67}Ga-citratului la nivelul unor procese inflamatorii a fost semnalată la puţin timp după introducerea produsului în diagnosticul oncologic. Comportarea nespecific tumorală a radiofarmaceuticului îi limitează valoarea diagnostică etiologică conferindu-i în schimb valenţe mai largi de utilizare medicală într-un alt domeniu în care mijloacele de localizare topografică paraclinică sînt încă reduse, respectiv cel al infecţiilor — inflamaţiilor oculte.

În aceste cazuri acumularea radiogaliului este de utilitate indiscutabilă în diagnosticul topografic, dar fără valoare intrinsecă sau chiar cu rol perturbator în elaborarea diagnosticului etiologic.

Mecanismul acumulării radiofarmaceuticului la nivelul proceselor septice este necunoscut. Printre explicaţiile propuse citäm intervenţia complexului galiu-proteină care exudează în ţesutul infectat, ca şi posibilitatea pătrunderii ^{67}Ga la nivelul zonei de localizare a infecţiei prin legarea *in vivo* de granulocitele care migrează în focar [32, 33, 34].

Demonstrarea recentă a faptului că lactoferina leagă ^{67}Ga-citratul mai avid chiar decît transferina şi corelarea acestei proprietăţi cu prezenţa lactoferinei în neutrofile oferă o explicaţie suplimentară tropismului radiofarmaceuticului pentru ţesutul inflamat [35].

2.1.5. DOZE UTILIZATE, IRADIERE, EFECTE SECUNDARE

În diagnosticul oncologic se administrează intravenos doze de 40—60 μCi/kg corp ^{67}Ga-citrat. De obicei vizualizarea scintigrafică se efectuează la 48—72 ore de la injectare; ţinînd însă seama de biocinetica PRF ca şi de obiectivul diagnostic avut în vedere, se poate urmări distri-

buţia sa de la 6 ore pînă la 120 ore. Pentru a grăbi eliminarea activităţii intestinale, se recomandă administrarea de laxative şi efectuarea de clisme repetate.

Iradierea organismului calculată în razi/mCi injectat este de 0,9 pentru porţiunea distală a intestinului gros, 0,28 şi 0,24 pentru ovare respectiv testicule, 0,41 pentru rinichi, 0,46 pentru ficat, 0,44 pentru sistemul osos + măduva osoasă, 0,53 pentru splină şi 0,26 pentru întregul corp [11].

S-au semnalat rareori efecte secundare, cele posibile fiind mai ales de tip alergic.

2.1.6. INDICAŢIILE UTILIZĂRII ^{67}GA-CITRATULUI ÎN SCINTIGRAFIA CLINICĂ

2.1.6.1. Diagnosticul oncologic. Utilitatea clinică a ^{67}Ga-citratului în diagnosticul oncologic este condiţionată de respectarea riguroasă a unor indicaţii corecte de aplicare.

Trebuie subliniat faptul că ^{67}Ga-citratul, datorită lipsei sale de specificitate pentru tumorile maligne, este total inadecvat în depistarea oncologică de masă. Indicaţiile sale sînt strict limitate la unele tipuri de procese tumorale maligne şi numai în anumite etape diagnostice sau de urmărire terapeutică. Prin elucidarea şi aprofundarea indicaţiilor de utilizare a ^{67}Ga-citratului în tumorile maligne procentul cazurilor fals negative a scăzut de la 43% în 1970 la 21% în 1973, iar vizualizările corect pozitive au crescut în această perioadă de la 57 la 79% [36]. Fundamentală rămîne atitudinea de a considera întotdeauna ^{67}Ga-citratul drept un agent de localizare topografică şi nu un PRF cu atribute de diagnostic etiologic.

Indicaţii majore de investigaţie oncologică sînt limfoamele maligne şi tumorile bronho-pulmonare.

În boala Hodgkin scintigrafia de întreg corp cu ^{67}Ga-citrat are un rol important în stadializarea afecţiunii. Prin inventarierea neinvazivă a grupurilor limfatice interesate de procesul granulomatos malign ce acumulează PRF se poate realiza rapid şi destul de exact încadrarea stadială a bolnavului. Rezultatele cercetărilor interinstituţionale [37] demonstrează că în 88% din cazurile netratate încă imaginea scintigrafică pozitivă confirmă interesarea ganglionară, că în 7% din cazuri se întîlnesc imagini fals pozitive, iar în 11% din cazuri diagnosticul este echivoc.

Diagnosticul se dovedeşte a fi mai exact pentru masele ganglionare situate intratoracic (90% vizualizări corecte) decît pentru cele intraabdominale (48%).

În limfoamele nehodgkiniene procentul imaginilor corect pozitive este de 50—55%, cu variaţii ce merg de la 36% pentru tipurile limfocitare slab diferenţiate pînă la 70% pentru tipul histiocitar [22].

În cancerele pulmonare primare [23] procentul cazurilor pozitive este de 80—85%, ^{67}Ga-citratul fiind capabil să evidenţieze leziuni nedetectate prin alte metode. Scintigrafia cu galiu poate fi o procedură diagnostică importantă în aprecierea metastazării loco-regionale (fig. 2.3), mai ales pentru staţiile ganglionare hilare şi mediastinale [38]. În cancerele pulmonare secundare unor localizări viscerale se publică [39] vizualizări pozitive de 100%. Trebuie însă reţinut faptul că o serie largă de pneumopatii (abcese pulmonare, pneumonii, tuberculoză, sarcoidoză) pot

furniza imagini scintigrafice galiu-pozitive; ţinînd seama de incidenţa imaginilor fals pozitive şi fals negative ca şi de nespecificitatea trasorului se apreciază probabilistic că la 100 de pacienţi suspectaţi de cancer pulmonar existenţa unei imagini pozitive cu ^{67}Ga-citrat creşte probabilitatea de malignitate de la 85% la 96%, în timp ce o scintigrafie negativă scade probabilitatea de la 85% la 37% [40]. Aceste cifre delimitează valoarea ^{67}Ga-citratului în investigarea tumorilor pulmonare, stabilindu-i utilitatea drept complement al examenului radiologic [41].

În afara indicaţiilor majore de mai sus ^{67}Ga-citratul are utilitate diagnostică mai redusă şi în alte entităţi oncologice:

a) diagnosticul diferenţial al formaţiilor lacunare intrahepatice; cancerele primitive hepatice concentrează radiofarmaceuticul în circa 70% din cazuri, spre deosebire de cirozele hepatice şi chistele hidatice la care acumularea este absentă [42, 43, 44]; b) diagnosticul diferenţial între tumorile cerebrale maligne (^{67}Ga-captante) şi leziunile cerebrovasculare (acumulare redusă a ^{67}Ga-citratului) [45]; c) urmărirea eficienţei terapiei oncologice şi stabilirea precoce a apariţiei recidivelor post-terapeutice [26, 43, 46].

În ceea ce priveşte cancerul mamar rezultatele obţinute pînă în prezent sînt puţin convingătoare [47] dacă le comparăm cu eficienţa celorlalte mijloace de investigaţie existente ca şi cu faptul că ^{67}Ga-citratul se acumulează în glanda mamară stimulată fiziologic.

Dintre celelalte tumori maligne este de reţinut procentul de aproximativ 50% vizualizări corect pozitive obţinut pentru melanoame şi cancere tiroidiene precum şi de 95% pentru sarcoamele primitive osoase [13].

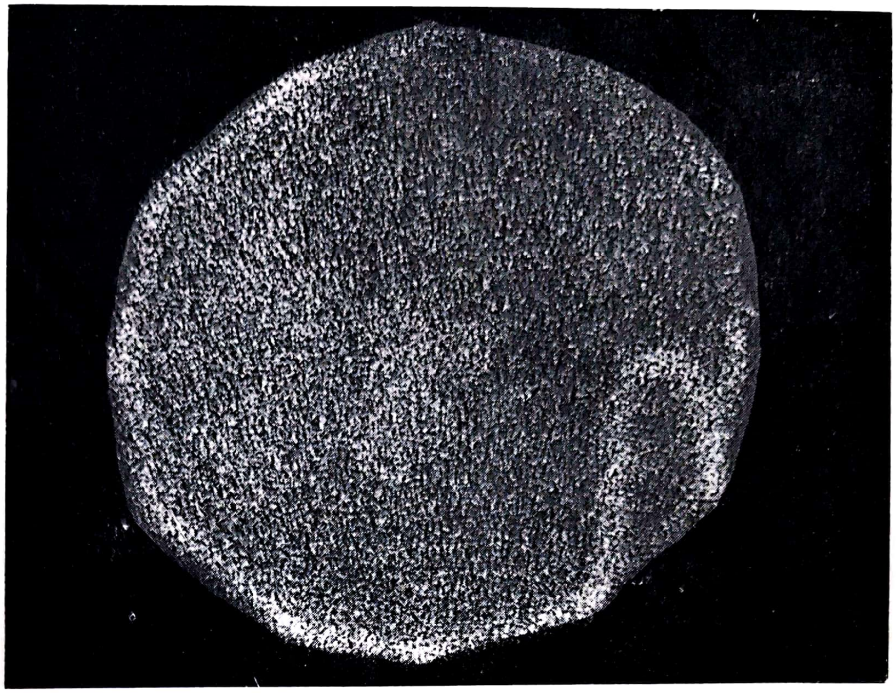
2.1.6.2. **Localizarea proceselor infecţioase.** Absenţa selectivităţii exclusiv tumorale a ^{67}Ga-citratului a dus la lărgirea indicaţiilor sale de utilizare şi în domeniul proceselor infecţioase localizate. Scintigrafia de întreg corp cu ^{67}Ga-citrat capătă valoare clinică în acele cazuri în care elementele diagnostice pledează pentru existenţa unui proces septic localizat al cărui sediu este însă incert sau neindentificat. Lista proceselor septice ce pot fi localizate pe această cale include abcesele abdominale profunde sau retroperitoneale (subfrenice, perinefretice), abcesele pulmonare, abcesele hepatice (parazitare sau microbiene), abcesele cerebrale, infecţii urinare, empiemul vezicii biliare şi altele [41, 42, 43, 44, 45]. Un rafinament diagnostic care ameliorează specificitatea metodei este localizarea abceselor prin leucocite marcate cu ^{67}Ga-citrat [52].

În cadrul unei stări febrile prelungite, orientarea topografică pe care eventual o realizează ^{67}Ga-citratul nu elucidează diagnosticul diferenţial proces tumoral malign — proces septic localizat, dar localizează biopuncţia sau intervenţia chirurgicală.

2.2. RADIOBLEOMICINELE

Bleomicina, antibiotic cu activitate antitumorală, a fost izolat de Umezawa şi colab. în anul 1966; plecîndu-se de la oncofilia produsului, cercetători francezi [53] au investigat posibilitatea marcării cu radionuclizi gamma emiţători adecvaţi realizării unui PRF de vizualizare tumorală şi au reuşit să lărgească sfera diagnostică a medicinii nucleare.

Scanned with OKEN Scanner



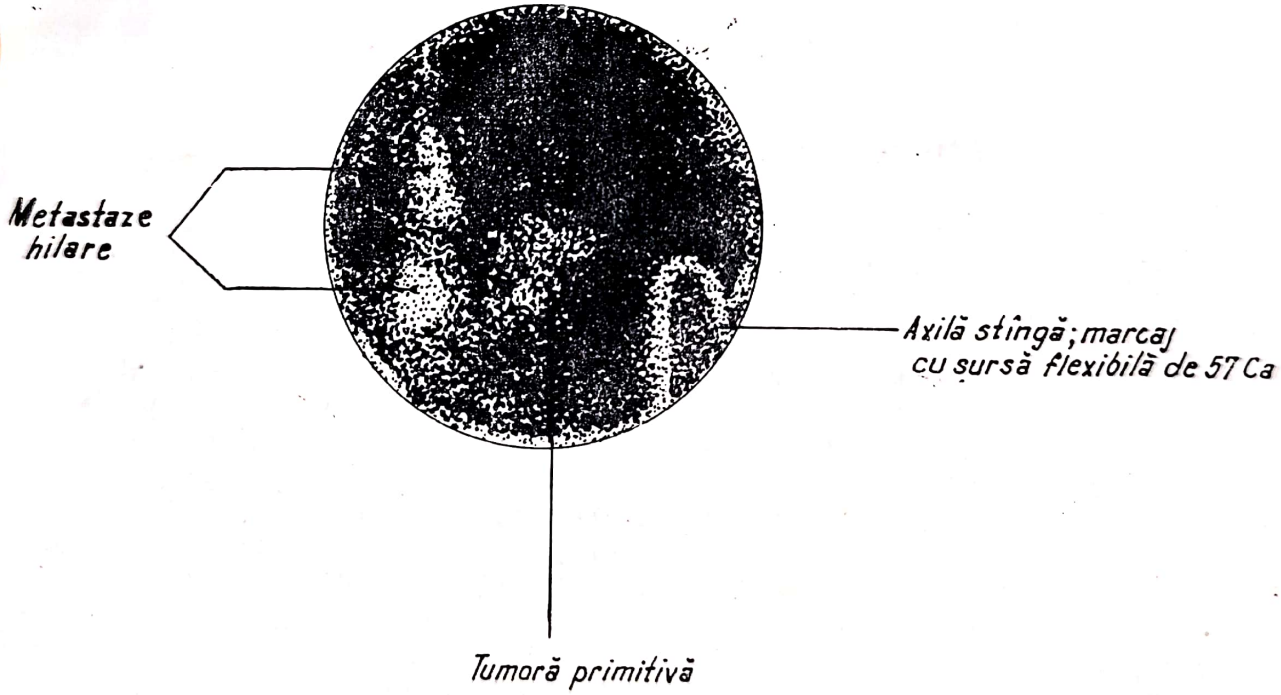


Fig. 2.3. — ^{57}Ga-citratul în vizualizarea tumorilor pulmonare; tumoră malignă cu metastaze hilare.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.1. STRUCTURA

Bleomicina, antibiotic produs de către o sușă de *streptomyces verticillus*, reprezintă un amestec de glicopeptide hidrosolubile conținînd cupru. S-a demonstrat existența unei structuri de bază comune (acidul bleomicinic) la care se leagă variate grupări aminice terminale. În tratamentul oncologic se folosește fie un amestec al acestor polipeptide, fie componenta A_2 purificată care are o greutate moleculară de aproximativ 1300 [54].

Renault și colab. [53] studiază procesul de chelare al unor cationi radioactivi prin bleomicină și conchid că stabilitatea maximă, *în vitro* și *in vivo*, se obține cu ^{57}cobalt și ^{67}cupru. În afara acestor radionuclizi a mai fost realizată marcarea bleomicinei cu ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{131}I, ^{67}Ga [55, 56, 57, 58], pentru a nu enumera decît radionuclizii de interes practic în scintigrafie. Marcarea bleomicinei cu diverși radionuclizi de interes clinic ridică o serie de probleme teoretice și practice : a) bleomicina este o moleculă mică a cărei activitate și distribuție biologică pot fi semnificativ modificate de atașarea unui radionuclid ; b) acțiunile biologice și efectele secundare ale bleomicinei obligă la obținerea de activități specifice mari care să permită administrarea unei radioactivități adecvate vizualizării de emisie atașată la o cantitate cît mai redusă de antibiotic ; c) comportarea biologică a antibioticului radioactiv este funcție de metoda de marcare utilizată ; cu același radionuclid se pot obține radiobleomicine cu stabilitate și farmacocinetică total diferită.

2.2.2. ELEMENTE DE FARMACOCINETICĂ

Multitudinea posibilităților de marcare a bleomicinei obligă la investigarea biocineticii experimentale a variaților produși rezultați ; importanță clinică dovedesc bleomicinele marcate ca ^{57}Co, ^{99m}Tc și ^{111}In. (^{57}Co-Bleo, ^{99m}Tc-Bleo, ^{111}In-Bleo).

2.2.2.1. Clearance sanguin; eliminare urinară. ^{57}Co-Bleo prezintă o epurare sanguină bifazică dar rapidă ; pe diverse modele experimentale, la două ore de la injectare radioactivitatea este mai mică de 0,1% din doza administrată [59]. La om clearance-ul sanguin este de asemenea rapid, radioactivitatea pe litru de sînge în raport cu doza administrată scăzînd la 7—8% după 15—20 minute, 2% după 5 ore și cel mult 0,5% după 24 ore [60, 61]. Eliminarea ^{57}Co-Bleo este în principal urinară, comportîndu-se ca un chelat cu excreție glomerulară rapidă ; 70—80% din doză se elimină în urina primelor 24 ore și 80—90% în primele 48 de ore. În primele 12 ore aproximativ 99% din radioactivitatea urinară se dovedește a fi ^{57}Co-Bleo ; procentul ^{57}cobaltului ionic din urină crește apoi treptat, pentru ca între 24 și 48 de ore numai 80% din radioactivitatea excretată să fie legată de antibiotic [61].

^{111}In-Bleo are o epurare plasmatică mai lentă, apreciată cifric la un ordin de mărime diferență față de epurarea ^{57}Co-Bleo [61, 62]. La om se descrie o epurare sanguină biexponențială, cu un timp de înjumătățire mediu de 110 min pentru componenta rapidă și de 15—30 ore pentru componenta lentă [63]. Excreția radioactivității administrate se face atît urinar cît și prin fecale, eliminarea a circa 50% din doză necesitînd 48 ore [56].

Scanned with OKEN Scanner

^{99m}Tc-Bleo are prima componentă de epurare plasmatică cu un $T_{1/2}$ de 12 minute; eliminarea urinară este relativ rapidă, aproximativ 68% din doza administrată fiind excretată în primele 6 ore [55].

2.2.2.2. **Distribuţie şi oncotropism experimental.** Rezultatele publicate în ultimii ani au dus la acumularea de suficiente date care să permită încercări de sinteză, în pofida faptului că cercetările au fost efectuate cu bleomicine diferit marcate şi cu variaţi radionuclizi, iar modelele experimentale folosite sînt rareori comparabile. În această lumină apar cu atît mai valoroase recentele rezultate [59] obţinute pe şoareci cărora li s-a transplantat carcinomul KHJJ şi la care s-au testat printr-o metodologie unică distribuţia ^{57}Co-Bleo, ^{111}In-Bleo şi ^{99m}Tc-Bleo demonstrîndu-se biocinetica superioară a ^{57}Co-Bleo care se elimină rapid din sînge şi nu se acumulează în organele normale.

În ceea ce priveşte oncotropismul experimental tabela 2.3 permite compararea rezultatelor obţinute cu cele trei PRF pe diferite tipuri de tumori la şobolan şi şoarece.

TABELA 2.3

Compararea rapoartelor $\frac{\text{tumoră}}{\text{sînge}}$ şi $\frac{\text{tumoră}}{\text{ficat}}$ obţinute cu diferite PRF ale bleomicinei la animale purtătoare de tumori experimentale (la 24 ore pentru ^{57}Co-Bleo şi ^{111}In-Bleo; 6 ore pentru ^{99m}Tc-Bleo)

Radiofarmaceutic	Tipul tumorii	Animal	Raport tumoră/sînge	Raport tumoră/ficat	Bibliografie
^{57}Co-Bleomicina	carcinom Ehrlich	şoarece	72	24	[54]
	adenocarcinom KHJJ	şoarece	4,9	1,03	[59]
	carcinom renal BICR/A12	şobolan	30	2,7	[64]
^{111}In-Bleomicina	carcinom Ehrlich	şoarece	3,4	0,4	[54]
	adenocarcinom KHJJ	şoarece	2,6	1,2	[59]
	carcinom renal BICR/A12	şobolan	1,3	0,6	[64]
^{99m}Tc-Bleomicina	adenocarcinom KHJJ	şoarece	0,76	0,56	[59]
	adenocarcinom KHJJ	şoarece	2,8	1,6	[64]
	fibrosarcom	şoarece	10	1	[64]

Se remarcă faptul că cele mai avantajoase rapoarte tumoră/sînge se obţin cu ^{57}Co-Bleo.

Datele experimentale au demonstrat stabilitatea diferită *in vivo* pentru bleomicina marcată cu diferiţi gamma emiţători. ^{57}Co-Bleomicina dovedeşte o foarte bună stabilitate *in vivo*, iar cercetările radiocromatografice demonstrează atît eliminarea urinară a produsului sub formă radiochimică nemodificată cît şi prezenţa la nivel tisular a aceluiaşi radiochelat [64].

^{111}In-Bleo ,în schimb disociază *in vivo*, radionuclidul fiind deplasat de pe antibiotic pe transferină şi alte proteine [65]; este de asemenea confirmat faptul că radioactivitatea acumulată în tumori experimentale la 24 ore de la injectare nu reprezintă ^{111}In-Bleo ci radionuclidul legat

probabil de proteine [64, 66]. Se pare că încă din primele ore după administrare ^{111}In-Bleo se disociază şi circulă legat de proteine, iar după 24 ore comportarea sa biologică este identică cu a ^{111}In Cl [67].

^{99m}Tc-Bleo pare a diferi în stabilitate funcţie de metoda folosită în preparare [66].

2.2.2.3. **Distribuţie şi oncotropism clinic.** Studiul distribuţiei ^{57}Co-Bleo la om arată întotdeauna prezenţa PRF la nivelul rinichiului şi vezicii urinare; ficatul este şi el adesea vizualizat dar la intensităţi mai mici. Uneori, mai ales atunci cînd cantitatea de $^{57}Co^{++}$ liber este mai mare de 1%, pot fi vizualizate glandele salivare sau tractul gastro-intestinal [61]. În ceea ce priveşte ^{111}In-Bleo scintigrafia normală la 48 ore [68] arată prezenţa considerabilă a radioactivităţii la nivelul ficatului, rinichilor şi măduvei osoase; vizualizarea splinei este variabilă dealtfel ca şi existenţa unei reduse activităţi intestinale. Se citează acumulări ale ^{111}In-Bleo în glanda mamară normală ca şi în regiunea genitală. ^{99m}Tc-Bleo este vizualizată normal în primele 2 ore la nivelul rinichilor, vezicii urinare, spaţiilor vasculare (cord şi vase mari) şi în zona masivului facial [69].

Oncotropismul diferitelor preparate de bleomicină marcată ca şi eficienţa lor în diagnosticul clinic sînt încă în curs de cercetare. ^{57}Co-Bleo cea mai larg studiată [61, 70, 71, 72] dovedeşte un oncotropism cert pentru tumorile pulmonare pe care le vizualizează în 70—95% din cazuri, ca şi pentru glioblastoame cerebrale (98% vizualizări pozitive) şi limfoame maligne. Cancerul mamar nu este vizualizat decît în 45—50% din cazuri; rezultate interesante, necesitînd însă loturi mai largi, s-au obţinut în tumorile hepatice, ale capului-gîtului ca şi în cancerele esofagiene. Ca şi pentru alţi agenţi de vizualizare tumorală, fixarea ^{57}Co-Bleo nu este specifică, obţinîndu-se un procent relativ important de imagini pozitive în inflamaţii şi afecţiuni benigne [54].

Servituţile farmacocinetice ale ^{111}In-Bleo duc la oncofilie mai redusă, fapt care adăugat calităţii mai slabe a imaginilor o fac inferioară ^{57}Co-Bleo [62, 73, 74].

Rezultatele comunicate cu ^{99m}Tc-Bleo par a fi promiţătoare pentru diagnosticul tumorilor maligne, cu condiţia ca marcarea produsului să fie făcută prin reducere cu Sn^{++}; în acest caz Mori şi colab. [69] vizualizează 85% din tumorile maligne ale feţei şi gîtului, 88% din cele pulmonare şi 78% din cele abdominale (ficat, pancreas, tract gastrointestinal). Atunci cînd marcarea se face prin electroliză, ^{99m}Tc-Bleo se dovedeşte un agent ineficient de vizualizare [75].

2.2.3. MECANISMUL LOCALIZĂRII TUMORALE

Efectul terapeutic antitumoral al bleomicinei este explicat prin interacţiunea antibioticului cu acizii nucleici. Umezawa [76] consideră că bleomicina inhibă sinteza DNA prin fragmentarea moleculei dublu elicoidale.

Bleomicina marcată cu gamma emiţători, se diferenţiază prin două aspecte fundamentale de bleomicină nemarcată: a) tumorile vizualizabile prin bleomicina marcată nu se suprapun cu cele asupra cărora acţionează terapeutic bleomicina; b) mecanismul localizării tumorale a radiobleomicinei poate fi diferit funcţie de gamma-radionuclidul utilizat şi de stabilitatea marcării.

Scanned with OKEN Scanner

^{57}Co-Bleo a cărei stabilitate *in vivo* este demonstrată, păstrează în mare biocinetica antibioticului, activitatea ^{57}Co fiind regăsită legată de bleomicină şi la nivelul DNA-ului din omogenatele de tumori [54]. Marcarea cu ^{57}Co a componentelor A_1, A_2, dimetil A_2 şi B_2 ale bleomicinei, urmată de studiul biologic al localizării lor tumorale demonstrează că fracţiunile A_2 şi B_2 sînt cele mai indicate pentru vizualizarea diagnostică oncologică, întrucît realizează atît rapoarte ridicate ţesut tumoral/ţesut normal cît şi concentraţii tumorale absolute ridicate [69]. Cercetări ulterioare confirmă superioritatea fracţiunii A_2 care permite obţinerea unor valori de 99 ale raportului tumoră/sînge [78].

^{111}In-Bleo — care disociază *in vivo* şi transferă radionuclidul pe proteinele plasmatice, recunoaşte un mecanism diferit de localizare tumorală; localizarea subcelulară a radioactivităţii după injectarea de ^{111}In-Bleo nu se face pe DNA ci ^{111}In este regăsit în fracţiunea lisosomială [74]. Se discută două mecanisme posibile de localizare tumorală a ^{111}In-Bleo: a) transport proteic simplu, caz în care ^{111}In-Bleo nu ar diferi în eficienţă de vizualizare faţă de $^{111}InCl_3$; ipoteza este susţinută de rezultate experimentale [66] care nu găsesc diferenţe semnificative în distribuţia intracelulară a radioactivităţii după administrarea de clorură sau antibiotic marcate cu ^{111}In; b) bleomicina ar putea acţiona ca un agent de difuziune pentru indiu, contribuind la distribuţia tisulară mai rapidă a acestuia, decît în cazul formei ionice.

^{99m}Tc-Bleo a fost mai puţin studiată din punctul de vedere al mecanismului de acumulare tumorală; s-a demonstrat [69] că produsul marcat cu ^{99m}Tc conservă numai 2,5% din activitatea biologică antimicrobiană iniţială dar păstrează capacitatea de a se concentra în diferite ţesuturi tumorale.

2.2.4. POSOLOGIE — IRADIERE — EFECTE SECUNDARE

Dozele recomandate pentru diferitele preparate diagnostice de bleomicină marcată sînt: ^{57}Co-Bleo: 0,5—1,5 mCi cu efectuarea scintigrafiei după 24 — 72 h; ^{111}In-Bleo: 2 mCi cu efectuarea vizualizării după 48—72 ore; ^{99m}Tc-Bleo: 3—5 mCi cu efectuarea vizualizării după 15 — 120 minute.

Iradierea produsă de dozele diagnostice este prezentată, după calculele diferiţilor autori, în tabela 2.4.

TABELA 2.4

Iradierea diagnostică produsă de diferite preparate ale bleomicinei marcate

Organul	^{57}Co-Bleo		^{111}In-Bleo		^{99m}Tc-Bleo
	Reba [54] rad/0,75 mCi	Rasker [61] rad/1 mCi	Novel [70] rad/2 mCi	Graham [63] rad/1 mCi	Mori [69] rad/5 mCi
Întreg corp	0,04	0,09	4—6	—	0,002
Măduvă	—	—	—	0,79	—
Rinichi	0,05	2	0,5	1,36 (cort.) + 1,64 (medul.)	0,1
Ficat	—	0,4	1	1,61	—
Ovare	0,05	—	—	0,19	—
Testicule	0,05	—	—	—	—
Vezica urinară	—	1,4	1	0,59	0,1

În ceea ce privește efectele secundare, experiența terapeutică căpătată cu bleomicina nemarcată arată că la doze de 10—15 mg pot apărea ca incidente frecvente febra în ziua injecției, anorexie, greață, astenie. Activitatea specifică uzuală a produselor diagnostice de bleomicină impune injectarea unor cantități de antibiotic de 2—15 mg, situație în care efectele secundare, deși rare, sînt posibile.

2.2.5. PROBLEME PRIVIND INDICAȚIILE DE UTILIZARE A RADIOBLEOMICINELOR ÎN DIAGNOSTICUL ONCOLOGIC

Trei grupe de preocupări marchează în prezent problematica utilizării diagnostice a bleomicinelor marcate.

Primul aspect se referă la alegerea radionuclidului, care nu are numai implicații de ordin fizic ci se repercută și asupra stabilității, respectiv biocineticii produsului final. ^{57}Co-Bleo întrunește cele mai multe sufragii, în pofida $T_{1/2}$ fizic lung al ^{57}Co, care — dacă nu se repercută asupra dozei de iradiere datorită biocineticii avantajoase — creează probleme de contaminare intraspitalicească ca și de colectare, stocare și tratare a deșeurilor biologice rezultate.

O altă serie de preocupări constau în compararea valorii diagnostice a diferitelor bleomicine, cu cea a PRF oncotrop de referință, ^{67}Ga-citratul.

Dacă ^{111}In-Bleo se dovedește în studiile clinice inferioară ^{67}Ga-citratului, în schimb atît ^{57}Co cît și ^{99m}Tc-Bleo competiționează cu radiogaliul.

O serie de publicații [75, 77, 79] susțin superioritatea ^{57}Co-Bleo față de ^{67}Ga-citrat argumentînd cu următoarele avantaje farmacocinetice:

a) vizualizarea normală numai a rinichilor și căilor urinare;

b) epurare sanguină rapidă cu realizarea unor rapoarte radioactivitate $\frac{\text{tumoră}}{\text{sînge}}$ ridicate, implicînd efectuarea investigației diagnostice la interval de timp mai scurt de la injectarea PRF;

c) spectru de vizualizare tumorală mai larg, incluzînd și unele forme de adenocarcinoame.

^{57}Co-Bleo se aseamănă cu ^{67}Ga-citratul în ceea ce privește lipsa de specificitate tumorală, deși se pare că antibioticul marcat înregistrează un procent mai scăzut de vizualizări în procese inflamatorii și tumorale benigne.

Al treilea grup de preocupări constau în indicațiile diagnostice diferențiale ale ^{67}Ga-citratului și ^{57}Co-bleomicinei.

Indicația majoră și preferențială a ^{67}Ga-citratului rămîne limfoamele maligne și în special stadializarea neinvazivă a bolii Hodgkin. În tumorile maligne pulmonare ambele radiofarmaceutice par a da rezultate asemănătoare, deși unele publicații preferă ^{57}Co-Bleo.

Bleomicina marcată pare a fi avantajoasă în diagnosticul glioblastoamelor cerebrale, în tumorile capului și gîtului, precum și în adenocarcinoamele digestive.

★

Scanned with OKEN Scanner

^{67}Ga-citratul şi bleomicinele marcate reprezintă produse semnificative în domeniul radiofarmaceuticelor oncotrope actuale, dar prezentarea lor este departe de a epuiza gama largă de preocupări existente în acest domeniu. O multitudine de produse sînt testate în diagnosticul pozitiv al tumorilor maligne, lipsind însă criterii unitare de abordare şi rezolvare a acestei dificile problematici. Chiar o recentă publicaţie a Agenţiei Internaţionale pentru Energie Atomică [4] utilizează simultan trei criterii diferite de grupare în capitole a datelor existente, ceea ce ilustrează dificultăţile de clasificare inerente domeniilor insuficient elucidate.

Eforturile de a găsi un suport de transport radionuclidic cu adresă selectiv tumorală se orientează atît către precursori metabolici specifici cît şi către anticorpii specifici pentru un anumit tip de ţesut tumoral. Progresele pe aceste căi logice de cercetare sînt condiţionate însă de identificarea şi separarea respectivilor factori, probleme indisolubil legate de elucidarea unor mari necunoscute în etiopatogenia, patofiziologia şi chimioterapia tumorilor maligne.

BIBLIOGRAFIE

1. R.L. Hayes, C.L. Edwards, „Medical radioisotope scintigraphy", vol. II, p. 531, IAEA, Vienna, 1973.
2. J. Esteban Velasco, „Proc. First World Congr. Nucl. Med.", p. 115, Tokyo—Kyoto, 1974.
3. RADIOPHARMACEUTICALS, Part 12 Tumors, Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975.
4. * * * „Tumor localization with radioactive agents", IAEA, Vienna, 1976.
5. R. Plagne, G. Meyniel, J. Robert, "Detection sélective des tumeurs malignes", în „Médecine Nucleaire", vol. 2, p. 408, Flammarion Médicine Sciences, Paris, 1975.
6. R.L. Hayes, în "Radioactive pharmaceuticals" p. 603, U.S. Atomic Energy Commission Conf. 65.1111, Oak Ridge, 1966.
7. C.L. Edwards, R.L. Hayes, *J. Nucl. Med.*, **10**, 103 (1969).
8. G. Hor, K. Kempken, H. Kriegel şi colab., "Proc. First World Congr. Nucl. Med.", Tokyo-Kyoto, 1974, p. 332.
9. U. Haubold, E. Aulbert, în "Medical radioisotope scintigraphy", vol. 2, p. 553, IAEA, Vienna, 1973.
10. H. Langhammer, G. Hör, K. Kempken şi colab. în "Tumor localization with radioactive agents", p. 69, IAEA, Vienna, 1976.
11. M.I.R.D., Dose estimate report No. 2, *J. Nucl. Med.*, **14**, 755 (1973).
12. G.B. Saha, P.A. Farrer, în "Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med., New York, 1975, p. 435.
13. S.M. Larson, S.M. Milder, G. Johnston, în "Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med., New York, 1975, p. 413.
14. R.C. Small, L.R. Bennett, *J. Nucl. Med.*, **12**, 394 (1971).
15. F.A. Bueno, A.G.Embuena, J.L. Romero şi colab., în „Medical radioisotope scintigraphy", vol. 2, IAEA, Vienna, 1973, p. 595.
16. K. Machida, H. Yasukochi, T. Sugawara şi colab., "Proc. First World Congr. Nucl. Med.", Tokyo-Kyoto, 1974, p. 940.
17. S.M. Larson, G.L. Schall, *J.A.M.A.*, **218**, 257, (1971).
18. P.A.G., Hammersley, M.N. Cauchi, D.M. Taylor, *Cancer Res.*, **35**, 1154 (1975).
19. A.Ando, K. Hisada, "Proc. First World Congr. Nucl. Med.", Tokyo-Kyoto, 1974, p. 946.
20. H. Langhammer, G. Hor, P. Heidenreich şi colab., în "Medical radioisotope scintigraphy" vol. 2, IAEA, Vienna, 1973, p. 607.
21. G. Johnston, R.S. Benua, C.C. Teates şi colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 399 (1974).
22. R.H. Greenlaw, M.B. Weinstein, B. Brill şi colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 404 (1974).
23. F. H. De Land, J. L. Sauerbrunn, Ch. Boyd, *J. Nucl. Med.*, **15**, 408 (1974).
24. Z.H. Oster, S.M. Larson, H.N. Wagner, *J. Nucl. Med.*, **17**, 356 (1974).
25. S.R. Hurwitz, P.L. Hagan, N. Alazraki, *J. Nucl. Med.*, **16**, 280 (1975).
26. T. Higashi, K. Kashima şi colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 243 (1977).
27. H.S. Winchell, P.D. Sanchez, C.K. Watanabe, *J. Nucl. Med.*, **11**, 459 (1970).
28. R.L. Hayes, *J. Nucl. Med.*, **18**, 740 (1977).
29. P. Bichel, H.H. Hansen, *Br. J. Radiol.*, **45**, 182 (1972).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE PENTRU EXPLORAREA GLANDEI TIROIDE *IN VIVO*

Explorarea radioizotopică a glandei tiroide reprezintă primul domeniu în care radionuclizii au găsit aplicaţii diagnostice de larg interes clinic. J.C. Hamilton şi M.H. Soley s-au înscris în istoria medicinii secolului nostru prin publicarea în anul 1940 a lucrării privind „metabolismul iodului de către glanda tiroidă *in situ* utilizînd iod radioactiv, la subiecţii normali şi la bolnavii cu diferite tipuri de guşă" [1]. După ce de-a lungul a cel puţin două decenii investigarea tiroidiană *in vivo* a deţinut locul principal între tehnicile medicinii nucleare, în prezent numărul acestor investigaţii este în evidentă scădere, datorită noilor posibilităţi apărute de a rezolva o serie de probleme diagnostice prin teste tiroidiene efectuate *in vitro*. Alături de această orientare se remarcă însă şi reale progrese calitative ale investigării *in vivo*, rezultînd din diversificarea PRF şi perfecţionarea aparaturii de detecţie şi vizualizare [2, 3]. Problema biocineticii PRF de explorare tiroidiană se suprapune în mare măsură cu cea a metabolismului iodului în organismul uman; interesul mai recent pentru ^{99m}Tc-pertechnetat ca agent de vizualizare tiroidiană a lărgit gama PRF folosite pentru investigarea acestui organ *in vivo*.

3.1. ELEMENTE DE BIOCINETICĂ A RADIOFARMACEUTICELOR UTILIZATE PENTRU EXPLORAREA TIROIDIANĂ

3.1.1. BIOCINETICA RADIOIODULUI

Metabolismul radioiodului reprezintă o problemă de interes medical larg, investigată multidisciplinar şi intensiv, cu tratare exhaustivă în monografii de specialitate [4, 5, 6, 7]. Datele schiţate mai jos încearcă să sumarizeze ciclul radioiodului în organism, subliniind unele etape cu implicaţii pe plan diagnostic (fig. 3.1).

Iodul exogen, introdus în organism pe cale digestivă (aport alimentar normal cca 300 μg zilnic) sau administrat parenteral în produse medicamentoase ajunge să se distribuie sub formă anorganică în spaţiul extratiroidian de iodură, spaţiu care este definit drept „volumul de lichid ce ar fi necesar pentru a conţine iodura din organism aflată la nivelul concentraţiei ei plasmatice" [8]. Cantitatea totală de iodură aflată în acest spaţiu constituie fondul metabolic comun iodurii anorganice extratiroidiene, apreciat în mod normal la 75 — 125 μg. Acest fond metabolic poate înregistra ample variaţii, în plus sau în minus, induse de multipli factori (aport alimentar, administrare de medicamente conţinînd iod, utilizarea produşilor de contrast radiologic iodaţi etc.), variaţii ce se repercută semnificativ asupra unor teste de explorare cu radioiod *in vivo*.

Scanned with OKEN Scanner

Din acest pool extratiroidian iodura este extrasă pe mai multe căi: secreţie salivară şi gastrică, excreţie renală precum şi prin captarea ei tiroidiană. Clearance-ul urinar al iodurii la subiectul eutiroidian este în medie de 35 ml/minut, iodura fiind filtrată glomerular şi reabsorbită tubular în procent de 70—75%. Captarea tiroidiană a iodurii este un proces de transport activ („pompă de iodură"), consumator de energie, realizînd o concentrare tiroidiană de iodură de 25—500 de ori mai mare

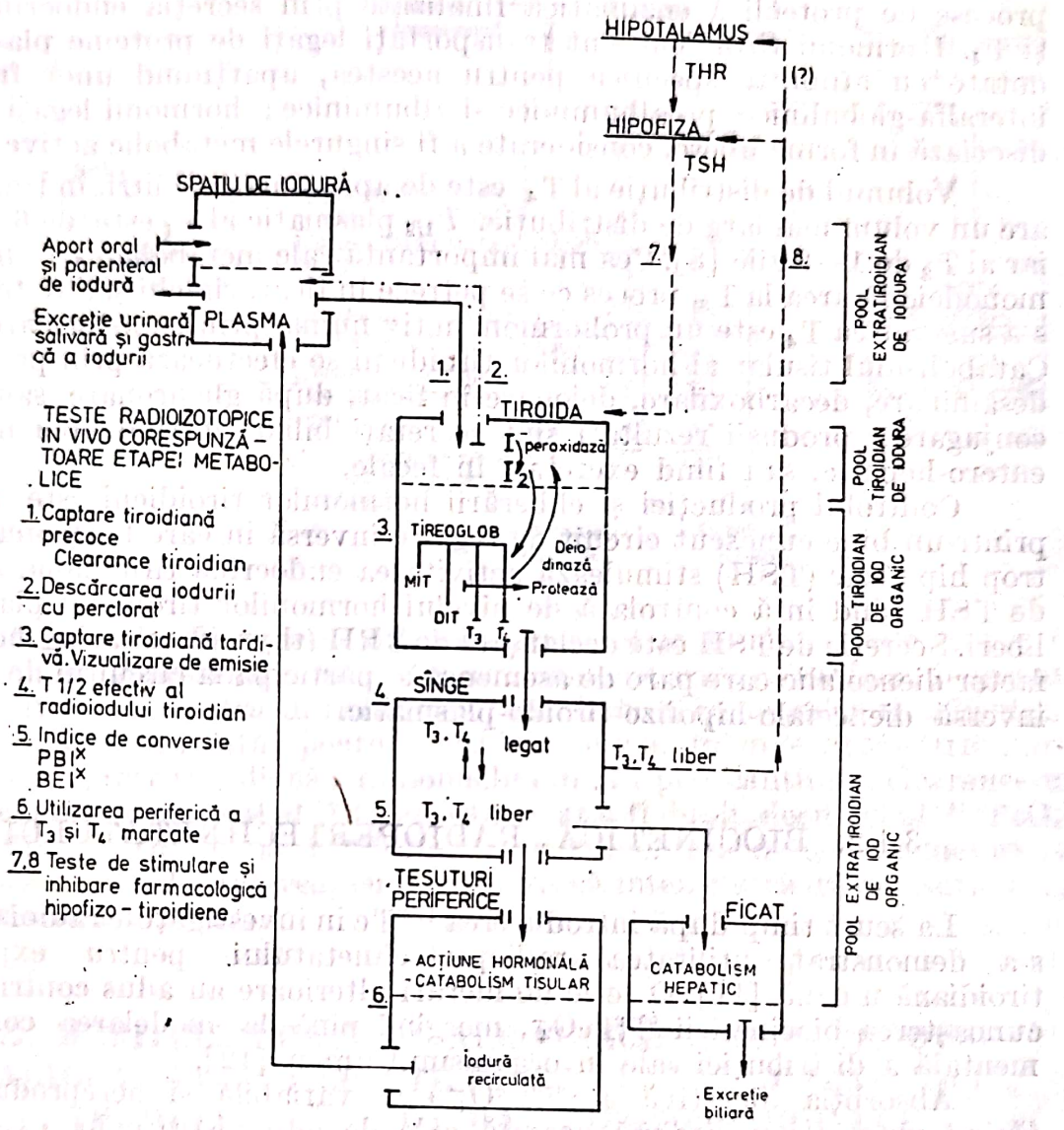


Fig. 3.1. — Schiţa etapelor metabolice ale radioiodului corelate cu testele corespunzătoare de explorare *in vivo*.

decît cea plasmatică. Clearance-ul tiroidian normal al iodurii este în medie de 17 ml plasmă/minut (3—45 ml) ceea ce corespunde la o captare absolută de aprox. 86 μg iodură/24 h. Numai o mică parte din iodura captată este „scăpată" îndărăt în plasmă, fără a fi organificată (aproximativ 10 μg/24 ore). Pe plan diagnostic, testul de radioiodocaptare tiroidiană apreciază fracţiunea din pool-ul de iodură transferată intratiroidian şi ca atare curba de captare tiroidiană a radioiodului exprimă atît starea funcţională tiroidiană cît şi condiţia pool-ului extratiroidian de iodură.

Iodura captată de tiroidă este rapid oxidată la iod molecular în prezenţa unei peroxidaze. Prin reacţii biochimice pe care nu le detaliem se

Scanned with OKEN Scanner

produce organificarea intratiroidiană a iodului; acesta se leagă de grupările tirozinice ale tireoglobulinei formînd monoiodtirozina (MIT) şi diiodtirozina (DIT). Cuplarea iodotirozinelor duce la formarea hormonilor tiroidieni, respectiv triiodotironina (T_3) şi tetraiodotironina (tiroxina, T_4). Iodotirozinele şi iodotironinele constituie fondul metabolic comun intratiroidian de iod organic apreciat la 6000—8000 μg [9, 10], formă de depozit a T_3 şi T_4. Eliberarea hormonilor tiroidieni de pe tireoglobulină presupune procese de proteoliză enzimatică finalizate prin secreţia endocrină a T_3 şi T_4. Hormonii tiroidieni sînt transportaţi legaţi de proteine plasmatice dotate cu afinitate specifică pentru acestea, aparţinînd unor fracţiuni interalfa-globulinice, prealbuminice şi albuminice; hormonii legaţi proteic disociază în forme libere, considerate a fi singurele metabolic active.

Volumul de distribuţie al T_4 este de aproximativ 9 litri, în timp ce T_3 are un volum mai larg de distribuţie. $T_{1/2}$ plasmatic al T_4 este de 6—8 zile, iar al T_3 de 1—2 zile [8]. Cea mai importantă cale metabolică a T_4 pare a fi monodeiodinarea la T_3, proces ce se petrece în ficat, rinichi şi alte ţesuturi; s-a sugerat că T_4 este un prohormon, activ numai prin transformare în T_3. Catabolismul tisular al hormonilor tiroidieni se efectuează prin procese de desaminare, decarboxilare, deiodare în ficat, după glicuronare sau sulfoconjugare; produşii rezultaţi sînt secretaţi biliar, intrînd apoi în ciclul entero-hepatic, sau fiind excretaţi în fecale.

Controlul producţiei şi eliberării hormonilor tiroidieni este realizat printr-un bine cunoscut circuit de reglare inversă în care hormonul tireotrop hipofizar (TSH) stimulează activitatea endocrină tiroidiană, secreţia de TSH fiind însă controlată de nivelul hormonilor tiroidieni plasmatici liberi. Secreţia de TSH este declanşată de TRH (thyroid releasing hormon), factor diencefalic care pare de asemenea a participa la circuitul de reglare inversă diencefalo-hipofizo-tiroido-plasmatic.

3.1.2. BIOCINETICA RADIOPERTECHNETATULUI

La scurt timp după introducerea ^{99m}Tc în investigaţiile radioizotopice s-a demonstrat utilitatea radiopertechnetatului pentru explorarea tiroidiană umană [11]. O serie de lucrări ulterioare au adus contribuţii la cunoaşterea biocineticii $^{99m}TcO_4^-$, mergînd pînă la modelarea compartimentală a distribuţiei sale în organismul uman [12].

Absorbţia digestivă a $^{99m}TcO_4^-$ este variabilă şi nereproductibilă, făcînd practic inutilizabilă această cale de administrare în explorările curente. Pertechnetatul administrat intravenos se repartizează multicompartimental şi este eliminat pe mai multe căi (fig. 3.2). Există argumente care pledează pentru faptul că, *in vitro* $^{99m}TcO_4^-$ se leagă de serumalbumină în proporţie de 65—80%, legătura fiind însă slabă şi complet reversibilă [14].

Principalele căi de excreţie sînt cea urinară şi digestivă (respectiv secreţie salivară gastrică şi intestinală). Clearance-ul renal al $^{99m}TcO_4^-$ este apreciat la o treime din cel al iodurii [12], ceea ce corespunde cu $13 \pm 0{,}47\%$ din clearance-ul inulinic [15]. Clearance-ul salivar şi gastric al $^{99m}TcO_4^-$ se cifrează la 50% din cel al iodurii [13, 16].

Pe plan endocrin, deosebirea biocinetică esenţială dintre aceşti doi ioni este de ordin calitativ, constînd în faptul că pertechnetatul, deşi captat

Scanned with OKEN Scanner

activ de către glanda tiroidă, nu este însă organificat în tiroida umană. Unele date experimentale demonstrînd organificarea intratiroidiană a $^{99m}TcO_4^-$ la șoareci și șobolani au fost infirmate pentru om [17]. Implica-

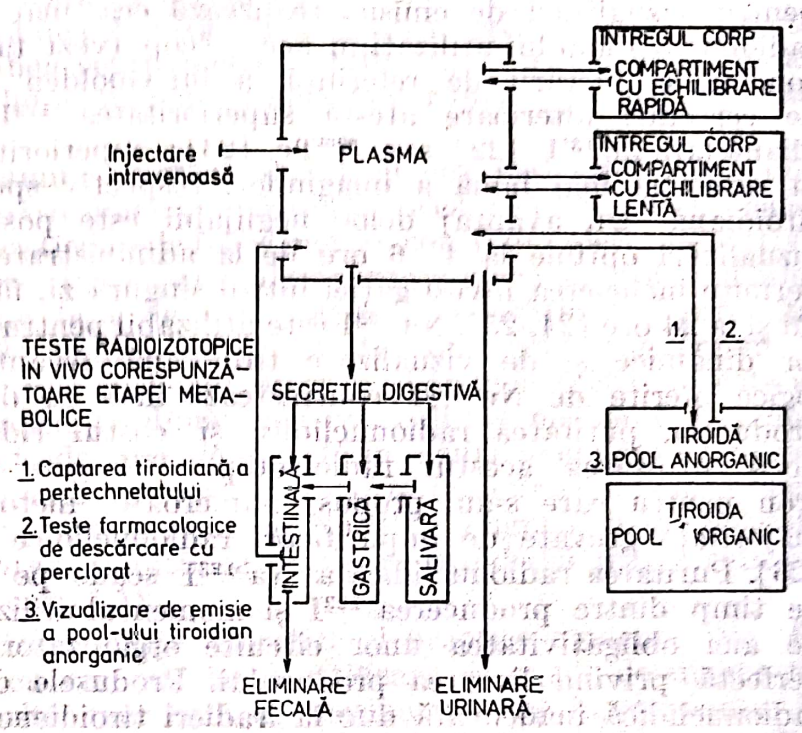


Fig. 3.2. — Schița etapelor metabolice ale ^{99m}Tc-pertechnetatului injectat intravenos; modificat după Hays și Berman [12].

țiile diagnostice ale acestei diferențe biocinetice fundamentale sînt evidente din compararea fig. 3.1 și 3.2 care demonstrează că radioiodul este un adevărat trasor pentru întregul ciclu metabolic al hormonilor tiroidieni, în timp ce pertechnetatul poate fi utilizat numai în investigații tributare etapei de captare tiroidiană a radionuclidului. Pe plan cantitativ clearance-ul tiroidian unidirecțional al $^{132}I^-$ este apreciat a fi dublu decît cel al $^{99m}TcO_4^-$ [18]. Fixarea tiroidiană a $^{99m}TcO_4^-$ este influențată de aceiași factori ce modifică radioiodocaptarea, cu mențiunea că intensitatea răspunsurilor nu este identică [19, 20].

3.2. MERITELE RELATIVE ALE PRINCIPALELOR PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE PENTRU DIAGNOSTICUL TIROIDIAN *IN VIVO*; RADIOIZOTOPII IODULUI

În marea majoritate a explorărilor de tiroidologie clinică se utilizează drept PRF iodura de sodiu administrată per os, mai rar intravenos. Dintre cei 30 de izotopi ai radioiodului și-au găsit utilizare pentru investigarea *in vivo* îndeosebi ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I și ^{132}I.

3.2.1. RADIONUCLIZI DE UZ CLINIC

3.2.1.1. **Na ^{123}I** este considerat în prezent drept radionuclidul „aproape ideal" pentru explorarea tiroidiană *in vivo* [10]; argumentele principale sînt de ordin fizic constînd în energia convenabilă a cuante-

lor gamma (159 keV) adecvată aparaturii de vizualizare ca și $T_{1/2}$ fizic scurt (13 ore). La aceasta se adaugă absența emisiei β ceea ce duce la condiții radiobiologice avantajoase. Na ^{123}I, la activitățile administrate pentru vizualizări de emisie, realizează cea mai mică iradiere dintre radionuclizii iodului utilizați în acest scop (vezi tabela 3.1). Confirmînd concluziile lucrării de referință a lui Goolden și colab. [21] o serie de cercetări ulterioare atestă superioritatea ^{123}I în vizualizarea tiroidiană față de ^{131}I [22] sau ^{99m}Tc [23]; superioritatea se concretizează în rezoluția mai bună a imaginilor, respectiv specificitatea metabolică tiroidiană. Un avantaj deloc neglijabil este posibilitatea obținerii de vizualizări optime la 4—6 ore de la administrarea Na^{123}I per os, ceea ce permite încheierea investigației într-o singură zi, fără revenirea subiectului și la 24 ore [24, 25]. Na ^{123}I este utilizabil pentru majoritatea explorărilor dinamice și de vizualizare tiroidiană. Avantajele tehnico-metodologice oferite de Na ^{123}I contrastează însă cu dificultățile ridicate de producția, puritatea radionuclidică și costul ridicat pe care le implică utilizarea acestui radioizotop. ^{123}I este un produs de ciclotron pentru care s-au propus numeroase metode de preparare, în majoritate grevate de impurificări radionuclidice cu ^{124}I, ^{125}I, ^{126}I, ^{131}I [26]. Puritatea radionuclidică a Na ^{123}I scade pe măsură ce intervalul de timp dintre producerea ^{123}I și momentul utilizării PRF crește [27]; de aici obligativitatea unor circuite organizatorice cu funcționalitate perfectă privind livrarea produsului. Produsele de Na ^{123}I cu puritate radionuclidică inadecvată duc la iradieri tiroidiene evident mai ridicate, iar pe plan tehnic pot produce degradarea calității imaginii scintigrafice. De asemenea, pe plan tehnic, pentru unele studii dinamice, determinările radiometrice mai exacte impun măsurători în coincidență ale radiațiilor X și gamma emise prin dezintegrarea ^{123}I, ceea ce presupune aparatură electronică dedicată exclusiv acestui tip de explorare [28].

Servituțile de procurabilitate și cost ridicat contracarează în mare măsură calitățile fizice ale ^{123}I așa încît, după cum se arăta pe bună dreptate, „valoarea clinică a Na ^{123}I depinde în ultimă instanță de asigurarea unor livrări constante și de accesibilitatea prețului acestora" [25].

3.2.1.2. **Na ^{125}I** a cunoscut o perioadă de apreciere pe linia testelor *in vivo* fiind recomandat în special pentru vizualizarea tiroidiană. Argumentele de ordin fizic (gamma emițător pur cu energia fotonilor de 35 keV) fundamentau calitatea superioară (rezoluție și contrast) a unor imagini scintigrafice obținute cu acest radionuclid în comparație cu cele rezultînd din utilizarea ^{131}I [29, 30]. Exploatarea diagnostică optimă a caracteristicilor fizice ale fotonilor ^{125}I impune însă folosirea unor cristale de NaI (Tl) cu dimensiuni speciale precum și colimatoare de construcție adecvată [31]. Na^{125}I a fost recomandat și pentru explorări tiroidiene dinamice *in vivo* dar energia fotonică a radionuclidului obligă pentru fiecare subiect investigat la efectuarea unor corecții privind grosimea și profunzimea tiroidei [32].

Deși $T_{1/2}$ fizic al ^{125}I este de 60 de zile, iradierea produsă la activități egale administrate se menține mai scăzută decît cea a Na ^{131}I tocmai datorită diferențelor în schemele de dezintegrare (tabela 3.1). Preconizat la un moment dat drept înlocuitorul Na ^{131}I pentru diagnosticul tiroidologic *in vivo* [33], Na ^{125}I nu a rezistat probei timpului, datorită următoarelor cauze: a) radionuclidul nu este utilizabil cu camerele de scintilație tip Anger, necesitînd aparate dedicate special ^{125}I, deci investiții materiale suplimentare [34]; b) avantajele radiobiologice și de rezoluție scintigrafică

Scanned with OKEN Scanner

nu par atît de importante încît să departajeze ^{125}I de alţi radionuclizi tireotropi, iar energia cuantelor gamma îl fac impropriu pentru detecţia formaţiilor iodocaptante retrosternale [2]; c) $T_{1/2}$ fizic lung ridică probleme suplimentare în tratarea deşeurilor radioactive; d) costul Na ^{125}I este cel puţin dublu faţă de cel al Na ^{131}I. Utilizat în prezent pentru investigaţii *in vivo* numai de unele centre medicale [10, 35], ^{125}I a cîştigat în schimb monopolul ca radionuclid de marcare a hormonilor folosiţi pentru explo ări tiroidiene *in vitro*.

3.2.1.3. **Na ^{131}I** rămîne încă produsul cu cea mai largă răspîndire practică pentru explorări tiroidiene *in vivo* cu toate că, pe plan radiofarmacologic, o serie din caracteristicile sale fizice menţin constantă alerta împotriva utilizării sale diagnostice. Principalele dezavantaje fizice ale radionuclidului sînt $T_{1/2}$ prea lung faţă de necesităţile investigaţionale, prezenţa emisiei corpusculare β^- (ambii factori citaţi conducînd convergent la creşterea inutilă a iradierii tiroidiene) precum şi energia relativ ridcată a radiaţiilor gamma (implicînd colimări masive, calitate mediocră a rezoluţiei scintigrafice, eficienţă de detecţie scăzută în cazul camerelor de scintilaţie tip Anger). Criteriile radiobiologice furnizează desigur argumentul esenţial împotriva utilizării diagnostice a Na ^{131}I, stigmatizarea formală a acestuia [36] fiind argumentată de iradierea tiroidiană foarte ridicată pe care o produce (tabela 3.1).

În pofida unor dezavantaje teoretice şi practice evidente, Na ^{131}I rămîne încă produsul cu cea mai largă utilizare ca agent de diagnostic tiroidian *in vivo*, datorită unor serii de motive pe care le enumerăm în continuare. PRF este folosit în majoritatea explorărilor tiroidiene (radioiodocaptare precoce şi tardivă, vizualizare tiroidiană inclusiv pentru localizarea metastazelor captante, studii dinamice acoperind etape esenţiale din metabolismul iodului în organism, determinări de farmacocinetică necesare calculelor de doză în terapia cu radioiod etc.), ceea ce duce la acceptări justificate de multitudinea valenţelor diagnostice. De asemenea Na ^{131}I are avantajul practic al produsului accesibil, obţinut la reactor nuclear, cu tehnologie de prelucrare radiochimică simplă; la aceasta se adaugă costul redus precum şi posibilitatea organizatorică de a dispune permanent de PRF chiar în laboratoarele cu volum redus de activitate sau aflate la distanţă de producător. În fine, acceptarea Na ^{131}I este dictată şi de lipsa unui alt radioizotop al iodului care să-l poată realmente înlocui integral în practica curentă.

Asistăm deci la perpetuarea paradoxului Na ^{131}I care deşi unanim recunoscut ca „indezirabil" în investigarea tiroidologică este totuşi fortuit utilizat chiar de cei ce îl critică, situaţie în care se găseşte şi autorul acestui capitol [37]. Se impun însă a fi subliniate următoarele restricţii legate de prescrierea diagnostică a Na ^{131}I : a) radiofarmaceuticul este contraindicat pentru explorarea tiroidiană pediatrică, mai ales la vîrste mici, unde iradierea produsă ar avea risc oncogenic semnificativ [38]; b) necesitatea discriminării atente a cazurilor indicate numai pentru radioiodocaptări — ce se pot efectua prin administrarea unor activităţi reduse de Na ^{131}I, [39] — de cazurile ce impun şi vizualizări tiroidiene cu radioiod sau studii de conversie, pentru a căror efectuare sînt necesare activităţi de ordinul 30—50 microCi; c) înlocuirea Na ^{131}I cu $^{99m}Tc\,O_4^-$ atunci cînd nu există indicaţie expresă de vizualizare tiroidiană prin radioiod (a se vedea 3.3).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.4. ^{132}**Iodul** poate fi considerat un radionuclid hibrid cu caracteristici fizice atît avantajoase cît și nedorite, fapt care pe de o parte îl plasează într-o bună poziție radiobiologică, iar pe de altă parte îi limitează gama de investigații în care poate fi prescris.

Într-adevăr, $T_{1/2}$ fizic scurt (2, 3 ore) face ca, în pofida unei abundente emisii β^+, iradierea tiroidiană să fie net inferioară celei produse de ^{125}I sau ^{131}I (tabela 3.1). Același $T_{1/2}$ fizic scurt face posibilă repetarea frecventă a investigațiilor atît în urmărirea evoluției afecțiunilor tiroidiene, cît și în cercetarea acțiunii diferiților factori asupra unor etape funcționale ale glandei tiroidiene [40, 41, 42, 43, 44, 45]. ^{132}Iodul este accesibil laboratoarelor de medicină nucleară prin eluare de pe generatorii cromatografici ^{132}Te — ^{132}I; costurile PRF/investigație devin avantajoase pentru laboratoarele ce efectuează în permanență un număr mare de investigații. Trebuie cunoscut faptul că la primele eluții ale generatorului sau atunci cînd acesta nu a fost folosit cîteva zile, eluatul poate avea o impurificare radionuclidică de 2—3% cu ^{131}I; de aici necesitatea efectuării unor eluții prealabile „de spălare" înaintea celor de lucru efectiv [46].

Caracteristicile fizice ce dezavantajează ^{132}I țin de spectrul pluri-energetic al cuantelor gamma și mai ales de energia ridicată a acestora, aspecte ce ridică probleme de colimare chiar în studiile de captare tiroidiană și fac ^{132}I impropriu procedurilor de vizualizare tiroidiană. Adăugînd la acestea $T_{1/2}$ fizic prea scurt, produsul poate fi practic utilizat numai pentru studii dinamice de scurtă durată și pentru teste farmacodinamice de stimulare sau frenare [42, 47].

3.2.2. FORME FARMACEUTICE DE ADMINISTRARE

Explorarea tiroidiană *in vivo* apelează cel mai adesea la calea orală de administrare a radioiodurii, procedură ce ridică uneori probleme de tehnică farmaceutică cu posibile repercusiuni pe plan diagnostic. Pentru Na ^{123}I și Na ^{131}I principalele forme farmaceutice utilizate sînt capsulele gelatinoase operculate și soluțiile apoase. Capsulele gelatinoase operculate prezintă avantajul comodității și facilitării unor măsuri de radioprotecție în manipularea și administrarea radioiodului; legat de această formă farmaceutică au fost semnalate însă două categorii de fapte ce pot duce la rezultate incorecte. Astfel, s-a arătat că uneori există variații de activitate nepermis de mari între conținutul capsulelor din aceeași livrare, variații soldate cu erori de pînă la 100% în aprecierea cifrelor radioiodocaptării tiroidiene [48].

Pe de altă parte deși, în general, capsulele gelatinoase operculate se desfac rapid în stomac [49] s-a demonstrat însă că valorile radioiodocaptării tiroidiene sînt semnificativ mai reduse în cazul utilizării acestei forme farmaceutice decît în cazul administrării soluțiilor de radioiodură [50, 51]. Explicațiile diferențelor constatate pot fi furnizate de: a) calitatea necorespunzătoare a capsulelor sau pulberilor de umplere folosite de unii producători; b) diferențe în digestia gastrică a capsulelor funcție de condițiile acido-peptice locale; c) întîrzierea absorbției intestinale a radioiodurii datorită formării unor complecși de iod-gelatină în tractul digestiv [50, 52, 53]. Toate aceste posibile

Scanned with OKEN Scanner

interferenţe justifică rezerva existentă privind oportunitatea administrării radioiodurii în capsule gelatinoase operculate atunci cînd se explorează captarea tiroidiană precoce (2—4 ore), cazuri în care este preferată folosirea soluţiilor de radioiodură.

Soluţiile de radioiodură, fie sterile şi apirogene administrabile intravenos în explorările de clearance tiroidian, fie administrabile per os în celelalte explorări tiroidiene prezintă un risc crescut de contaminare. Cunoscută fiind volatilitatea iodului la temperaturile uzuale ale mediului înconjurător, manipularea soluţiilor de radioiodură implică un procent cert de evaporare a radionuclidului, mai ales atunci cînd nu se lucrează cu soluţii bazice şi cînd sînt prezenţi curenţi de aer [54]. Ţinînd seama că radioiodul pătruns în organism pe cale inhalatorie suferă un proces de resorbţie pulmonară, contaminarea internă în cazul manipulării soluţiilor de radioiodură reprezintă un risc potenţial care obligă la respectarea riguroasă a normelor de radioprotecţie.

3.2.3. DOZELE DE IRADIERE INTERNĂ REZULTÎND DIN UTILIZAREA DIAGNOSTICĂ A RADIOIZOTOPILOR IODULUI

Lucrarea de referinţă în aprecierea iradierii tiroidiene la administrarea radioiodurii este constituită de raportul MIRD [55] care calculează dozele considerînd purităţi radionuclidice şi radiochimice de 100%. Raportul foloseşte pentru cinetica iodului modelul propus de Berman [7] şi îl aplică pentru trei nivele de radioiodocaptare tiroidiană maximă, respectiv 5%, 15% şi 25%, cifre ce acoperă valorile normale ale populaţiei din Statele Unite, dar care nu corespund cu cele din ţara noastră unde media valorilor normale este apreciată la 38% [3].

În tabela 3.1 s-au preluat dozele de iradiere estimate pentru radioiodocaptări tiroidiene maxime de 25% şi au fost calculate valorile ce rezultă după administrarea activităţilor uzual folosite pentru efectuarea de captări sau scintigrafii tiroidiene.

Dozele de iradiere în explorarea pediatrică cu radioiodură de sodiu sînt în mod evident mai mari [55].

TABELA 3.1

Aprecierea dozelor de iradiere după administrarea iodurii de sodiu

Nr. crt.	Radionuclid	Procedeu	Activit. administrată, μCi	Doza de iradiere (mrad)					
				Tiroida	Stomac	Măduva	Testicule	Ovare	Întreg corp
1	Na ^{123}I	RIC	25	325	5,2	0,75	0,3	0,8	0,73
		Scintigr.	200	2600	42	6	2,4	6,2	5,8
2	Na ^{125}I	Scintigr.	50	39500	13	6	1,2	2	24,5
3	Na ^{131}I	RIC	5	6500	7	1,3	0,44	0,7	3,5
		Scintigr.	50	65000	70	13	4,4	7	35
4	Na ^{132}I	RIC	50	650	55	4,6	3,7	6,5	5,5

Scanned with OKEN Scanner

3.3. MERITELE RELATIVE ALE PRINCIPALELOR PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE PENTRU DIAGNOSTICUL TIROIDIAN *IN VIVO*; ^{99m}Tc-Pertechnetatul

Avantajele radiobiologice şi caracteristicile fizice ale fotonilor gamma au recomandat $^{99m}TcO_4^-$ în explorarea tiroidiană atît pentru investigaţii dinamice cît şi pentru vizualizări scintigrafice.

Captarea tiroidiană a radiopertechnetatului a fost extensiv cercetată în vederea asimilării ei drept test paraclinic înlocuitor al radioiodocaptării; la 20 minute de la injectarea intravenoasă valorile medii ale captării tiroidiene a $^{99m}TcO_4^-$ la subiecţi normali variază între 0,9 şi 3,7%, după diverşi autori [3, 57, 58, 59, 60]. Aceste valori sînt crescute în hipertiroidii şi guşi iodoprive, existînd o bună corelaţie liniară între cifrele radioiodocaptării precoce şi cele ale fixării tiroidiene a radiopertechnetatului; de aici utilizarea $^{99m}TcO_4^-$ în diagnosticul şi urmărirea evoluţiei terapeutice a hiperfuncţiilor tiroidiene [61, 62, 63]. Deşi promiţător pe plan diagnostic, testul captării tiroidiene a $^{99m}TcO_4^-$ este grevat de inconveniente tehnice decurgînd din farmacocinetica produsului, respectiv fondul tisular peritiroidian ridicat datorit atît PRF circulant cît şi radioactivităţii glandelor salivare din vecinătate. Obţinerea unor rezultate corecte este condiţionată de excluderea activităţii peritiroidiene, ceea ce pe plan metodologic impune determinări scintigrafice cantitative pentru calculul procentului de captare glandulară a radiopertechnetatului. Pe planul interpretării clinice trebuie avut în permanenţă în minte faptul că folosirea $^{99m}TcO_4^-$ ca radiotrasor dă informaţii numai asupra etapei de captare tiroidiană şi că acest PRF nu suferă procesul de organificare intratiroidiană.

Vizualizarea scintigrafică a tiroidei cu $^{99m}TcO_4^-$ prezintă de asemenea un interes deosebit în medicina nucleară, confirmat de experienţa unor laboratoare ce publică rezultate obţinute pe loturi mai mari de 1000 cazuri [64, 65]. Principalele argumente aduse în favoarea radiopertechnetatului — comparativ cu Na ^{131}I — sînt: a) avantajul radiobiologic ilustrat de faptul că iradierea tiroidiană produsă de 1 mCi $^{99m}TcO_4^-$ (0,3 rad/mCi) este de aproximativ 200 ori mai mică decît cea rezultînd din administrarea a 50 μCi Na ^{131}I, respectivele activităţi reprezentînd cantitatea de radioprodus necesară, în medie, pentru efectuarea unei scintigrafii tiroidiene; b) calitatea superioară a imaginii decurgînd din rezoluţia spaţială mai bună la energia de 140 keV faţă de 364 keV precum şi din statistica scintigrafică ce avantajează pertechnetatul; c) economia de timp, atît pentru subiectul investigat cît şi pentru personalul laboratorului; d) posibilitatea de a vizualiza cu pertechnetat unele tiroide blocate prin produşi iodaţi, glande ce nu pot fi scintigrafiate cu radioiod [65, 66].

Aceste multiple avantaje ale $^{99m}TcO_4^-$ asupra Na ^{131}I nu pot fi însă valorificate în toate domeniile scintigrafiei tiroidiene. Într-adevăr, s-au semnalat şi confirmat limitele radiopertechnetatului în investigarea nodulilor tiroidieni unde noduli reci la investigarea cu Na ^{131}I, atestaţi histopatologic drept cancere tiroidiene, apar izo- sau hipercaptanţi prin folosirea pertechnetatului [67, 68, 69, 70].

Pentru explicarea discrepanţelor dintre cele două PRF în diagnosticul nodulilor reci, unde pertechnetatul poate da rezultatele fals negative, s-a emis ipoteza că în asemenea cazuri procesul de transport al radiotrasorului (captare) localizat probabil la periferia celulelor este intact, în timp ce

Scanned with OKEN Scanner

mecanismul de organificare (la care $^{99m}TcO_4^-$ nu are acces) este lezat şi afuncţional [73, 74].

Confuziile şi erorile diagnostice pe care le poate induce în aceste cazuri utilizarea pertechnetatului au făcut ca respectivul PRF să nu mai fie acceptat pentru investigarea scintigrafică a nodulilor tiroidieni unici sau a guşilor nodulare, situaţii în care se recomandă folosirea radioiodului [65, 71, 72]. În diagnosticul nodulilor reci, pentru a satisface cumulativ criteriile radiobiologice, farmacocinetice şi patofiziologice ar fi indicat Na ^{123}I care rămîne încă inaccesibil practicii curente [22, 25, 75].

Etichetînd radiopertechnetatul drept un bioanalog imperfect al radioiodului — neindicat pentru investigarea nodulilor tiroidieni — trebuie însă să subliniem că acest PRF se valorifică excelent în situaţiile în care este necesară numai aprecierea poziţiei, formei şi dimensiunilor glandei tiroide.

3.4. CRITERII DE PRESCRIPŢIE A RADIOFARMACEUTICELOR UTILIZATE PENTRU EXPLORAREA GLANDEI TIROIDE *IN VIVO*

Deşi o bună parte din patologia tiroidiană poate fi abordată şi rezolvată pe plan diagnostic prin folosirea exclusivă a testelor *in vitro*, PRF îşi păstrează o serie de indicaţii prioritare, pentru efectuarea de investigaţii *in vivo* [2, 3, 76, 77, 78, 79].
În figura 3.3 este schiţat modul general de gîndire în prescripţia PRF pentru efectuarea explorărilor tiroidiene *in vivo*.

Scintigrafia tiroidiană este domeniul care rămîne încă dependent de administrarea PRF; ^{99m}Tc-pertechnetatul reprezintă opţiunea primară, cu respectarea următoarelor excepţii care obligă la folosirea radioiodului: nodulii solitari, guşile multinodulare, guşile retrosternale, bilanţul morfofuncţional al cancerelor tiroidiene şi metastazelor acestora. Trebuie subliniat faptul că în investigarea onco-tiroidiană Na ^{131}I este de neînlocuit.

În afara scintigrafiei tiroidiene PRF îşi mai găsesc justificări de prescripţie şi în situaţiile clinice enumerate în continuare:

a) Hipertiroidii în vederea stabilirii:

— diagnosticului de supresibilitate la T_3 (teste Werner) cu indicaţie optimă pentru folosirea Na ^{132}I, urmat în ordine de $^{99m}TcO_4^-$ şi Na ^{131}I (considerînd Na ^{123}I inaccesibil);

— diagnosticul tireotoxicozei factitia, indicaţie de exclusivitate a radioizotopilor iodului;

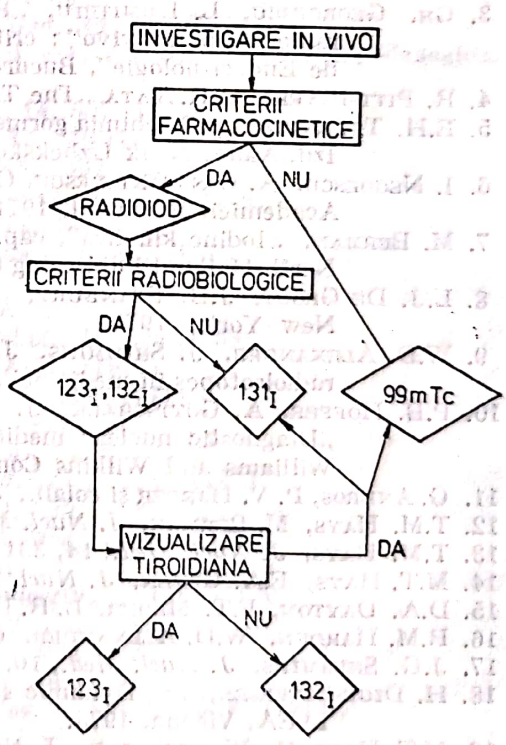


Fig. 3.3. — Schematizarea prescripţiei diferenţiate a PRF în explorarea tiroidiană.

— determinarea $T_{1/2}$ biologic tiroidian al iodului în vederea stabilirii dozei terapeutice de radionuclid; indicaţie prioritară pentru Na ^{131}I, urmat de Na ^{125}I.

b) Hipotiroidii în vederea stabilirii diagnosticului diferenţial, între formele primare şi secundare (stimulare cu TSH); se recomandă Na ^{132}I, Na^{123}I sau Na^{131}I.

c) Tiroidite acute şi subacute, atît pentru diagnosticul pozitiv cît şi pentru urmărirea evoluţiei sub tratament: PRF de preferat Na^{123}I, iar în absenţa acestuia, Na^{131}I (fiind necesare cel mai adesea şi vizualizări tiroidiene).

d) Distrofiile endemice tireopate în vederea determinării avidităţii pentru ioduri; în practică cel mai des utilizat este Na ^{131}I. Pentru diagnosticul dishormonogenezelor, investigaţiile mai elaborate biochimic, se efectuează de asemenea cu Na ^{131}I sau monoid—respectiv diiodtirozină marcată cu ^{131}I; în aceste cazuri se poate apela la dublu sau triplu marcaj izotopic tiroidian, ţinînd seama de faptul că proprietăţile fizice permit discriminarea *in vivo* a tandemurilor investigaţionale ^{131}I—^{125}I, ^{132}I—^{131}I, sau chiar a tripletei ^{132}I — ^{131}I — ^{125}I.

BIBLIOGRAFIE

1. J.G. Hamilton, M.H. Soley, *Amer. J. Physiol.*, **131**, 135 (1940).
2. H.N. Wellman „Proc. First. Congr. Nucl. Med. ", Tokyo-Kyoto, 1974, p. 396.
3. Gh. Georgescu, L. Dumitriu, „Probleme de explorare funcţională tiroidiană cu radioizotopi „in vivo" ; criterii şi opţiuni", Raport la „Al III-lea Congres Naţional de Endocrinologie", Bucureşti, oct. 1976.
4. R. Pitt-Rivers, J.R. Tata „The Thyroid Hormones", Pergamon Press, New York 1959.
5. E.H. Turakulov, „Biochimia gormonov scitovidnoi jelezi v norme i pri tiroidnoi patologii", Izd. Akad. Nauk Uzbekskoi S.S.R., Taşkent, 1962.
6. I. Negoescu, A. Constantinescu, C. Heltianu, „Biochimia hormonilor tiroidieni", Edit. Academiei, Bucureşti, 1971.
7. M. Berman, „Iodine kinetics", cap. 11, p. 172, în „The thyroid and biogenetic amines", North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, 1972.
8. L.J. De Groot, J.B. Stanbury, „The thyroid and its diseases", J. Wiley and Sons Inc. New York, 1975.
9. W.D. Alexander, J. Shimmins, J.W.K. Robertson şi colab., în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", p. 179, IAEA, Vienna, 1971.
10. P.B. Hoffer, A. Gottschalk, J. Quinn, „Thyroid in vivo studies", cap. 28, p. 255, în „Diagnostic nuclear medicine", Edit. A. Gottschalk, şi J. Potchen, The Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1976.
11. G. Andros, P. V. Harper şi colab., *J. Clin, Endocrinol. Metab.*, **25**, 1067 (1965).
12. T.M. Hays, M. Berman, *J. Nucl. Med.*, **18**, 898 (1977).
13. T.M. Hays, *J. Nucl. Med.*, **14**, 331 (1973).
14. M.T. Hays, F.A. Green, *J. Nucl. Med.*, **14**, 149 (1973).
15. D.A. Dayton, F.T. Maher, L. R. Elveback, *Mayo Clin. Proc.*, **44**, 549 (1969).
16. R.M. Harden, W.D. Alexander, *Clin. Sci. Hol. Med.*, **33**, 425 (1967).
17. J.G. Shimmins, *J. Nucl. Med.*, **10**, 637 (1969).
18. H. Dige-Petersen, în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", vol. 1, p. 353, IAEA, Vienna, 1975.
19. M.T. Hays, B. Wesselossky, *J. Nucl. Med.*, **14**, 785 (1973).
20. N.L. Atkins, *Sem. Nucl. Med.*, **1**, 345 (1971).
21. A.W.G. Goolden, H.I. Glass, D.J. Silvester, *Br. J. Radiol.*, **41**, 20 (1968).
22. H. Nishiyama, V.J. Sodd şi colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 261 (1974).
23. H.L. Atkins, J.F. Klopper şi colab., *Amer. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, **117**, 195 (1973).
24. S.L. Rosenthal, F.D. Hofeldt, T.A. Verdon., *J. Nucl. Med.*, **17**, 1050 (1976).
25. H.L. Atkins, A.N. Ansari şi colab., în „Radiopharmaceuticals", cap. 13, Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 134.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN EXPLORAREA BRONHO-PULMONARĂ

Aparatul respirator devine larg accesibil investigaţiilor clinice cu radioizotopi numai după ce Taplin şi colab. [1] concep şi validează la om un nou PRF, macroagregatele de serumalbumină umană, destinat explorării perfuziei pulmonare.

PRF utilizate în explorarea bronhopulmonară se pot clasifica, ţinînd seama de starea de agregare ca şi de obiectivul investigaţiei, în :

— produse radiofarmaceutice particulate de perfuzie (PRF — PP),
— produse radiofarmaceutice de inhalare ca aerosoli,
— gaze radioactive.

4.1. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE PARTICULATE DE PERFUZIE (PRF — PP)

4.1.1. PRINCIPIUL UTILIZĂRII ŞI CONDIŢII DE VALIDARE DIAGNOSTICĂ

Principiul utilizării diagnostice a PRF — PP constă în realizarea unor microembolizări minime şi anodine ale circulaţiei terminale pulmonare, ca urmare a injectării produsului radioactiv în sistemul venos periferic, microembolizări ce reproduc distribuţia fluxului sanguin local, permiţînd topografizarea acestuia prin mijloace de detecţie externă.

Considerarea distribuţiei intrapulmonare a PRF — PP drept reprezentativă pentru topografia perfuziei pulmonare impune validarea unor condiţii fundamentale :

a) PRF — PP se amestecă uniform în fluxul sanguin, comportîndu-se identic cu eritrocitele pînă în momentul impactării în reţeaua arterială terminală pulmonară ;

b) PRF — PP nu modifică prin prezenţa lor condiţiile hemodinamice locale ;

c) PRF — PP sînt extrase din circulaţia pulmonară cît mai complet la primul pasaj intrapulmonar, retenţia lor efectuîndu-se în mod anodin la nivelul microcirculaţiei terminale.

Primele două condiţii, predominant reologice au fost riguros confirmate [2, 3, 4, 5]. Cea de a treia cerinţă este condiţionată de raportul dintre morfofiziologia microcirculaţiei pulmonare, pe de o parte şi de dimensiunile, respectiv forma particulelor utilizate, pe de altă parte. Capilarele pulmonare formează o reţea densă tridimensională situată în

Scanned with OKEN Scanner

peretele alveolar; structura geometrică de bază a acestei rețele este aranjamentul hexagonal. Diametrul intern al acestor capilare alveolare este de 8,2 μm, cu limite de variație între 1—10 μm; s-a calculat la 280×10^9 numărul segmentelor capilare din pulmonul unui adult sănătos. Capilarele pulmonare provin din arteriolele precapilare al căror diametru variază între 17—59 μm; numărul lor total se cifrează la $200—400 \times 10^6$. Arteriolele precapilare succed arterelor de distribuție cu diametru de 60—100 μm și apreciate numeric la 40×10^6.

PRF — PP destinate vizualizării pulmonare trebuie să aibă dimensiuni superioare diametrului intern al vaselor din circulația terminală pulmonară, astfel încît ajunse la acest nivel ele să fie oprite în ochiurile „sitei" vasculare pulmonare. Pentru a nu se produce însă embolizări arteriolare pulmonare semnificative, se impune ca particulele să nu depășească dimensiunea de 100 μm.

În aceste condiții 80—95% din numărul particulelor injectate este oprit la nivelul circulației terminale pulmonare.

4.1.2. PRODUSE UTILIZATE — ELEMENTE DE BIOCINETICĂ

Definirea și clasificarea ține în principal de trei elemente ce caracterizează produsul.

Compoziția chimică a particulelor: se utilizează atît microparticule provenind din albumină umană (macroagregate de albumină și microsfere) cît și particule de Fe-hidroxid; compoziția chimică determină comportarea catabolică intrapulmonară a produsului ca și unele posibile efecte secundare.

Forma particulelor: macroagregatele au configurații complet neregulate, cu dimensiunile variabile funcție de axul considerat pentru măsurătoare; microsferele sînt produse omogene atît ca formă cît și ca dimensiuni.

Radionuclidul de marcare: după ce inițial a fost utilizat ^{131}I, în prezent ^{99m}Tc asigură caracteristicile fotonice și radiobiologice cele mai adecvate.

4.1.2.1. **Macroagregatele de albumină umană (MAA).** Dintre acestea inițial au fost folosite ^{131}I-MAA, iar ulterior ^{99m}Tc-MAA.

a) **^{131}I-MAA.** Produsul realizat de Taplin și colab. [1, 7] a cunoscut o largă utilizare practică.

Funcție de metoda de preparare și firma producătoare ^{131}I-MAA prezintă spectre de distribuție a dimensiunilor particulelor variabile, dar în majoritatea cazurilor 90—95% dintre ele sînt situate în domeniul 10—90 μm [7]. Chiar în condițiile producției de rutină, prin metode standardizate, preparatele prezintă mari variații de la livrare la livrare, în privința distribuției dimensionale a particulelor [8].

Într-un studiu recent, efectuat pe mai multe serii de produse comerciale [6], distribuția dimensională a particulelor a fost cea din figura 4.1.

Considerînd că în medie doza-standard de ^{131}I-MAA de 300 μCi are ca substrat un număr de aproximativ 10^6 particule, la dimensiunile de mai sus acestea vor impacta capilare în 38%, arteriole precapilare în 60% și artere de distribuție în 2%, realizînd obstrucția a 0,2% din totalul arteriolelor precapilare și 0,5% din arteriolele de distribuție existente în pulmonul uman sănătos [6].

Scanned with OKEN Scanner

În afara controlului dimensional, în practica scintigrafică este importantă și valoarea raportului $\frac{\text{radioactivitate pulmon}}{\text{radioactivitate hepatică}}$, determinat experimental ca biotest al calității produsului; la valori ale raportului mai mari de 10, PRF este satisfăcător din punct de vedere clinic [7].

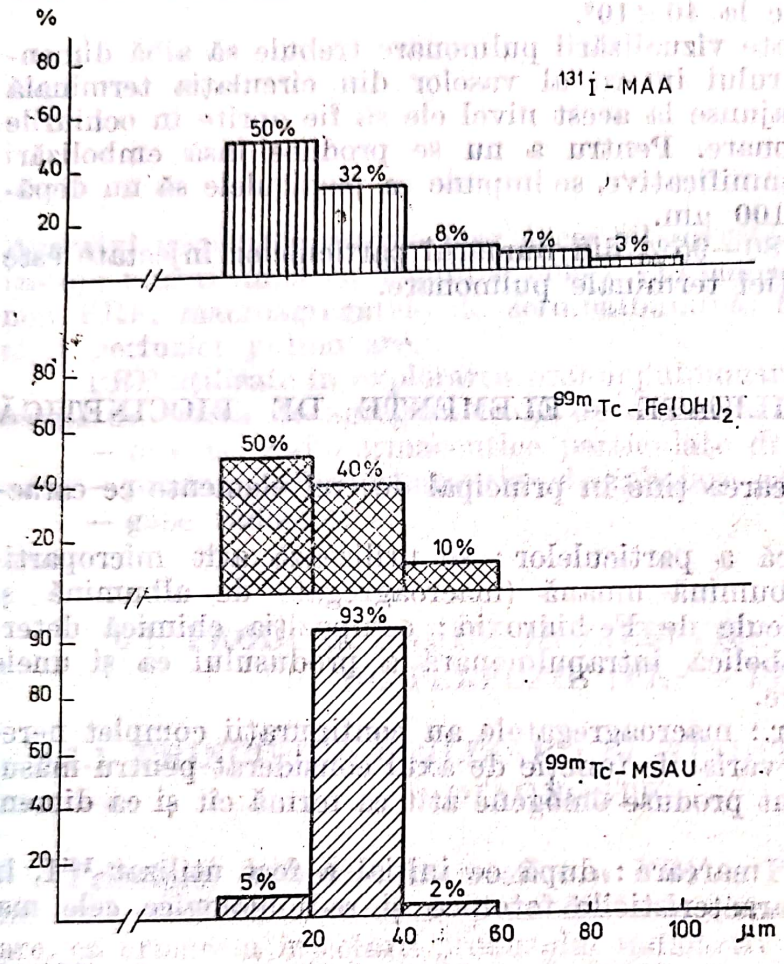


Fig. 4.1. — Distribuția dimensională a diferitelor tipuri de PRF—PP; după datele lui Davis [6].

În evaluarea farmacocineticii PRF—PP un deosebit interes prezintă procesul de îndepărtare din plămîn a radiofarmaceuticului. Epurarea din plămîn a ^{131}I-MAA realizează o curbă cu aspect multiexponențial. $T_{1/2}$ biologic mediu de dispariție din plămîn este de 0,25 zile pentru componenta rapidă a curbei și de 3,2 zile pentru cea de a doua componentă [9].

Particulele sînt epurate din pulmon prin două mecanisme principale: a) fragmentarea mecanică a MAA în particule din ce în ce mai mici, care coborînd sub 5µm pot traversa rețeaua capilară; b) degradarea enzimatică a albuminei denaturate [6]. Epurarea din pulmon se produce cu atît mai repede cu cît dimensiunile particulelor sînt mai apropiate de 10—20 µm și cu cît numărul lor total este mai redus [7].

Studiile de histomorfologie efectuate nu au evidențiat apariția în timp a unor procese reactive locale pulmonare în urma administrării ^{131}I-MAA.

Fragmentele de particule scăpate din patul vascular pulmonar sînt captate și catabolizate în majoritate de SRE.

Moleculele de ^{131}I eliberate catabolic din PRF intră în ciclul iodurii din organism, ceea ce duce la o iradiere tiroidiană apreciabilă și inutilă; de aici necesitatea blocării prealabile a tiroidei cu lugol în zilele premergătoare scintigrafiei pulmonare, deziderat neglijat adesea în practică și irealizabil în cazul investigațiilor de urgență.

b) **^{99m}Tc-MAA.** Înlocuirea ^{131}I prin ^{99m}Tc ca radionuclid de marcare a MAA este justificată atît de considerente radiobiologice cît și de avantajele tehnico-metodologice oferite de ^{99m}Tc în vizualizarea pulmonară [11]. Metodele inițiale de preparare a ^{99m}Tc-MAA erau dificil accesibile practicii curente de medicină nucleară; realizarea unor truse de marcare instantanee cu Sn-MAA a simplificat problema contribuind la utilizarea diagnostică largă a acestui PRF [12, 13].

Variatele produse comerciale conțin între 3×10^4 și 5×10^6 particule/mg MAA. Dimensiunile înregistrează, în general, aceleași variații ca și pentru ^{131}I-MAA, deși se pare că unele truse de preparare a ^{99m}Tc-MAA permit obținerea unui PRF cu peste 85% din particule în domeniul 10—60 μm [12]. Pe plan experimental epurarea biologică din plămîni înregistrează în medie valori ale $T_{1/2}$ de 6 ore, cu creșterea simultană a radioactivității hepatice [12]; datele de biocinetică umană par similare [13], epurarea pulmonară fiind însă mai lentă ($T_{1/2}$ de 20 h) în unele cazuri patologice.

Mecanismul degradării pulmonare este asemănător celui descris la ^{131}I-MAA, cu mențiunea că $T_{1/2}$ fizic scurt al ^{99m}Tc ca și captarea sa tiroidiană mai redusă fac inutilă administrarea lugolului pentru evitarea iradierii tiroidiene.

4.1.2.2. **Macroagregate de fier hidroxid.** Macroagregatele de fier hidroxid MA-Fe $(OH)_n$ au fost introduse de Stern și colab. [14] care marchează produsul cu ^{133m}In; pentru ^{99m}Tc se realizează compusul feric de către Yano și colab. [15], iar cel feros de Davis și colab. [16].

Preparatele propuse inițial pentru utilizare aveau spectrul de distribuție dimensională a particulelor asemănător ^{131}I-MAA: 50% mai mici de 20 μm, 32% între 20—40 μm, 8% între 40—60 μm, 7% între 60—80 μm și 3% între 80—100 μm [5]; ulterior se obțin produse cu caracteristici de distribuție dimensională mai avantajoase (vezi fig. 4.1).

După administrarea intravenoasă retenția pulmonară este în medie de 85%; procentul de radioactivitate hepatică imediat după injectare este mai ridicat decît la MAA (8—9% față de 1—2%) dar raportul radioactivitate $\frac{\text{pulmon}}{\text{ficat}}$ depășește valoarea de 10, necesară unor condiții corecte de vizualizare pulmonară [15, 17].

Cantitatea de fier administrată intravenos prin PRF, deși variabilă de la produs la produs, se menține de regulă sub 500 μg Fe, deci este evident mai mică decît dozele administrate pe aceeași cale în terapeutica marțială.

Problema fundamentală privind acest PRF—PP este cea a epurării produsului din pulmon și corelat de ea cea a posibilelor efecte tisulare nocive declanșate de rămînerea $Fe(OH)_n$ la nivelul patului vascular terminal pulmonar. O serie de cercetări experimentale, ale căror rezultate sînt sintetizate în tabela 4.1, atrag atenția asupra retenției prelungite a MA-$Fe(OH)_n$ la nivelul pulmonului, descriind o epurare triexponențială în care ponderea compartimentului lent este considerabilă.

Scanned with OKEN Scanner

În lumina acestor rezultate comportarea MA-$Fe(OH)_3$ apare complet diferită de cea a MAA marcată; reţinere prelungită a particulelor de Fe-hidroxid la nivelul pulmonului ridică problema efectelor secundare tisulare nocive.

Se descriu trei mecanisme de îndepărtare a particulelor de MA-$Fe(OH)_n$ din vasele obturate [21]. Principala modalitate este desfacerea macro-

TABELA 4.1

Epurarea din pulmon a macroagregatelor de Fe-hidroxid

Bibliografie	Produsul testat	Animal de exper.	$T_{1/2}$ biologic şi procentul epurat cu viteza respectivă					
			I		II		III	
			$T_{1/2}$	%	$T_{1/2}$	%	$T_{1/2}$	%
BARKER [18]	^{113m}In-^{59}Fe-$Fe(OH)_3$	şoarece	1 oră	19	3,8 zile	33	321 zile	48
GOODWIN [19]	^{114m}In-$Fe(OH)_3$	şoarece			20 ore	80	40—80 zile	10
WATTS [20]	^{99m}Tc-^{59}Fe-$Fe(OH)_3$	maimuţă	8 ore	45—54	6 zile	21—39	100 zile	15—38

agregatelor în particule mai mici submicronice, care trec prin patul capilar pulmonar intrînd în circulaţia generală unde sînt rapid fagocitate de SRE. Un al doilea mecanism constă în dizolvarea particulelor de hidroxid în fier ionic care este încorporat în celulele înconjurătoare. A treia modalitate de epurare constă în fagocitarea agregatelor de către macrofagele alveolare şi transportul limfatic al acestor „corpi străini". În ceea ce priveşte vitezele de îndepărtare pulmonară a MA-$Fe(OH)_2$, Davis [21] susţine existenţa unei epurări mai rapide din pulmon a produşilor feroşi faţă de cei ferici. Autorul susţine că la 6 luni de la injectare numărul particulelor remanente în pulmon este mai mic de 3%; chiar acceptînd aceste date, care nu concordă cu rezultatele citate anterior [18, 19, 20], epurarea pulmonară a MA-$Fe(OH)_2$ se dovedeşte a fi mult mai lentă decît cea a MAA.

4.1.2.3. Microsferele de serumalbumină umană (MSAU). Producerea microsferelor de albumină umană de către Rhodes şi colab. [22] reprezintă un progres conceptual şi practic respectiv realizarea unui PRF—PP biodegradabil cu omogenitate dimensională riguroasă, putînd fi marcat cu ^{99m}Tc sau ^{113m}In. În prezent se preferă domeniul dimensional 15—30 μm prepararea prin reducerea cu $SnCl_2$. În cursul marcării MSAU uscate suferă un proces de hidratare şi „balonizare"; pe 25 de şarje comerciale dimensiunile medii ale microsferelor uscate au fost de 22,1 ± 4,2 μm, iar cele ale produsului final de 30,2 ± 6,2 μm [23]. Numărul de microsfere pe miligram de albumină variază după producător între 60 000/mg şi 300 000/mg. Una dintre cele mai răspîndite truse comerciale de preparare a ^{99m}Tc-MSAU (3 M) conţine 140 — 160 000 microsfere/mg albumină.

Omogenitatea dimensională asigură localizarea microembolică a tuturor particulelor la acelaşi nivel microvascular, respectiv în arteriolele precapilare; pentru o doză medie/scintigrafie de 2×10^5 MSAU sînt

Scanned with OKEN Scanner

obturate aproximativ 0,06% din totalul arteriolelor precapilare ale pulmonului uman normal. Epurarea din pulmon a MSAU este rapidă; timpul mediu necesar pentru dispariţia totală a produsului din pulmonul şoarecelui este de 36 ore [23]; la om, clearance-ul din pulmon determinat prin radiometrie externă este biexponenţial componenta rapidă avînd un $T_{1/2}$ biologic de 3 ore, iar cea lentă de aproximativ 24 ore [24]. Procesul de biodegradare se produce prin invazia celulară a MSAU, cu modificări histopatologice reversibile şi probabil anodine la dozele uzuale [25, 26].

Prezenţa Sn metalic chiar în microcantităţi, ridică însă probleme nerezolvate încă privind inocuitatea totală a produsului comparativ cu MAA lipsite de acest aditiv [5].

4.1.3. IRADIERE

Pentru un $T_{1/2}$ biologic dat PRF—PP marcate cu ^{113m}In şi ^{99m}Tc produc, în mod evident, o iradiere pulmonară mult mai redusă decît cea a particulelor marcate cu ^{131}I.

Pentru ^{131}I-MAA iradierea pulmonară creşte aproape liniar odată cu prelungirea $T_{1/2}$ biologic, în timp ce pentru ^{113m}In şi ^{99m}Tc doza de iradiere atinge o valoare asimptotică după un $T_{1/2}$ biologic de 2—4 ore [27]. Iradierea comparativă produsă de diferitele PRF—PP este prezentată în tabela 4.2.

TABELA 4.2

Iradierea comparativă produsă de diferite radiofarmaceutice particulate utilizate în investigarea perfuziei pulmonare

Radiofarmaceutic	Activitate uzual administrată pe investigaţie mCi	Iradiere produsă rad/mCi			Bibliografie
		pulmon	întreg corp	alte organe	
^{131}I-MAA (tiroidă blocată	0,3	6	0,3	ficat 0,9	[24]
^{131}I-MAA (tiroidă neblocată)				tiroidă 300	[24]
^{99m}Tc-MAA	1—3	0,23—0,33	0,008	ficat 0,026	[12]
^{99m}Tc-$Fe(OH)_3$	1—3	0,150			[28]
^{113}In-$Fe(OH)_3$	1—3	0,75	0,01		[29]
^{99m}Tc-MSAU	1—3	0,150			[29]

Sînt evidente argumentele radiobiologice care pledează pentru evitarea utilizării ^{131}I-MAA, mai ales la pacienţi cu tiroida neblocată prin lugol, situaţie fortuit existentă în urgenţe sau în cazurile cu intoleranţă la iod.

4.1.4. TOXICITATE — EFECTE SECUNDARE

PRF—PP ridică probleme teoretice şi practice privind efectele secundare potenţiale, probleme întîlnite atît în cercetarea experimentală cît şi în utilizarea lor diagnostică la om. Pe plan experimental preocupările

Scanned with OKEN Scanner

existente se pot grupa în : a) determinarea efectelor secundare, toxice, asupra hemodinamicii pulmonare la cantităţi crescînde de PRF—PP cu identificarea factorilor determinanţi ; b) cercetarea în timp a posibilelor reacţii histopatologice pulmonare declanşate de remanenţa intravasculară a particulelor ; c) stabilirea comportării imunologice a PRF—PP.

Pe plan clinic s-au acumulat o serie de publicaţii care atenţionează asupra posibilelor incidente şi accidente legate de utilizarea acestor compuşi.

4.1.4.1. **Datele experimentale.** Se referă la efecte hemodinamice, histopatologice pulmonare, precum şi la comportarea imunologică.

Efecte hemodinamice. Investigaţiile efectuate pe această linie au urmărit să deceleze doza prag de la care apar modificări în presiunea arterială pulmonară după injectarea PRF—PP, şi să stabilească domeniul de siguranţă pentru dozele administrate la om.

Pentru ^{131}I-MAA se obţin la cîine [1] creşteri bruşte ale presiunii în artera pulmonară şi scăderi ale presiunii sistemice la doze de MAA dependente de dimensiunile particulelor. Doza prag de MAA care produce modificările hemodinamice citate este de 20—25 mg/kg, 10 mg/kg şi 5 mg/kg pentru dimensiuni mai mici de 80 μm, 150 μm şi respectiv 300 μm. Aceste rezultate care implică un factor de siguranţă de 1000 pentru dozele administrate la om sînt numai parţial confirmate de alte cercetări. Allen şi colab. [32] lucrînd cu MAA-Sn (dimensiuni 30—50 μm) urmăresc curba doză-efect a modificării presiunii arteriale medii pulmonare funcţie de cantitatea de MAA administrată.

Se observă modificări hemodinamice după administrarea unui număr de particule echivalent (pe kg/corp) cu doze de numai 60 de ori mai mari decît cele din scintigrafia pulmonară umană ; factorul de siguranţă sugerat de rezultatele acestor autori este de 125 — 150, spre deosebire de valoarea de 1000 propusă de Taplin [1].

MSAU par a fi de cel puţin două ori mai puţin toxice decît MAA [31]. Folosindu-se acelaşi parametru de referinţă (presiunea în artera pulmonară) s-a găsit [33] un factor de siguranţă de 2000, demonstrîndu-se existenţa unei zone largi de securitate între dozele utilizate în diagnosticul uman şi cele toxice. Rezultatele sînt confirmate şi de alte cercetări [34, 35].

Comportarea avantajoasă pe plan toxicologic a microsferelor faţă de macroagregate poate fi explicată în primul rînd prin dimensiunile particulelor.

S-a demonstrat [35] că răspunsul biologic acut concretizat prin DL_{50} este puţin influenţat de compoziţia particulelor dar că este funcţie strictă de dimensiunile acestora. Standardizarea formei ca şi diametrul mai redus al microsferelor le conferă o toleranţă superioară faţă de macroagregate. S-a propus ca dimensiune optimă pentru microsfere diametrul de 13,5 ± 1,5 μm [35].

Efecte histopatologice pulmonare. Dacă în determinarea răspunsului biologic acut compoziţia particulelor nu pare a fi determinantă, în schimb cercetările privind efectele histopatologice pulmonare cronice diferenţiază PRF—PP produse din serumalbumină umană de cele conţinînd $Fe(OH)_n$.

Studiile efectuate în timp pe această linie pledează în cazul MAA şi MSAU pentru absenţa unor efecte tisulare locale semnificative, biodegradarea şi epurarea produselor de albumină efectuîndu-se cu reacţii tisulare reduse şi rapid reversibile [1, 36]. Pentru macroagregatele de $Fe(OH)_3$ s-a demonstrat însă că remanenţa pulmonară prelungită este însoţită de modificări evidente, în secvenţa hiperemie focală a ţesuturilor înconjurătoare vasului embolizat, infarct hemoragic, inflamaţie perivasculară (70%

Scanned with OKEN Scanner

din cazuri), organizarea și uneori calcifierea embolusului [37]. Aceste procese sînt cel mai adesea finalizate prin obliterarea definitivă sau îngustarea semnificativă a respectivului vas terminal.

Este încă discutabil dacă reacțiile tisulare cu semnificație patologică citate mai sus ar fi declanșate numai de produși ferici și nu și de către cei feroși; Davis [38] susține că administrarea macroagregatelor de hidroxid feros nu produce în final leziuni pulmonare ireversibile și că starea de oxidare a fierului este corelată cu potențialul patologic al produsului.

Comportarea imunologică a serumalbuminei umane normale, comparativ cu cea a MAA și MSAU a fost extensiv investigată *in vivo* prin sensibilizări heterologe la cobai iar *in vitro* prin tehnici de imunodifuzie [39]. Rezultatele demonstrează că în comparație cu serumalbumina umană normală MAA este echivalentă sau chiar mai puternic antigenică; prezența albuminei solubile și a celei particulate în același preparat poate fi mai antigenică decît cea a albuminei solubile singure. În schimb MSAU pot sensibiliza cobaiul dar sînt rareori capabile să declanșeze fenomene anafilactice; se pare că în timpul producerii MSAU din albumina solubilă o serie de determinanți antigenici ai albuminei ar fi alterați sau mascați.

4.1.4.2. Efecte secundare în explorarea clinică. PRF—PP sînt printre puținii produși de diagnostic radioizotopic la care se ridică unele probleme de toxicologie clinică.

Marele număr de scintigrafii pulmonare în clinica umană demonstrează, în general, totala lor inocuitate în condițiile respectării unei posologii și mod de administrare adecvat. În mod curent, după administrarea diagnostică a PRF—PP nu s-au putut evidenția modificări biochimice, imunologice sau funcționale cardio-respiratorii [1, 7, 12, 23, 25].

În rare cazuri apar incidente minore de scurtă durată, constînd în simptome ce ar putea corespunde unor modificări tranzitorii ale hemodinamicii pulmonare: tahipnee, dispnee de diferite intensități, cianoză.

Senzația de căldură în extremitatea cefalică ca și înroșirea feței ce apar uneori după injectarea MA-Fe$(OH)_3$ amintesc de efectele secundare ale terapiei marțiale intravenoase.

Reacțiile alergice sînt extrem de rare dar posibile [40, 41]; trusa de urgență a oricărui laborator de medicină nucleară trebuie să conțină în permanență medicamentele necesare terapiei adecvate a accidentelor alergo-anafilactice.

Accidentele grave, unele chiar cu sfîrșit letal apar în mod cu totul excepțional [42, 43, 44] dar existența lor trebuie cunoscută. Exitusul provocat sau precipitat de administrarea PRF—PP recunoaște mecanisme alergo-anafilactice sau succede creșterilor bruște de rezistență și presiune ce survin în circulația pulmonară.

Apariția mai frecventă a unor accidente severe după MA-Fe$(OH)_n$ comparativ cu celelalte PRF—PP a făcut ca unele organizații științifice naționale să recomande retragerea MA-Fe$(OH)_n$ dintre produsele diagnostice ale medicinii nucleare [44].

Factorii de siguranță stabiliți experimental la animale normale au valabilitate limitată atunci cînd PRF—PP sînt administrate în clinica umană la bolnavi cu afecțiuni pulmonare severe, stare generală alterată și echilibre biologice precare. Pentru asemenea cazuri se impune prudență în stabilirea indicației de explorare, iar eventualul beneficiu diagnostic trebuie judecat în lumina posibilului risc investigațional. Un domeniu în care utilizarea PRF—PP este formal contraindicată este cel al bolnavilor cu

Scanned with OKEN Scanner

șunturi cardiace dreapta-stînga la care trecerea particulelor în circulația sistemică poate expune la accidente cerebrale.

Apariția accidentelor poate fi redusă la minimum și prin individualizarea dozei funcție de caz. În practica curentă numărul de particule administrat ca doză medie în scintigrafia pulmonară este de 10^6 pentru MAA, $0{,}5 \times 10^6$ pentru ^{99m}Tc-Fe(OH)$_n$ și $0{,}2 \times 10^6$ pentru MSAU [5]. Există însă date care atestă că numărul de particule compatibil cu o vizualizare pulmonară de calitate este mai redus, de numai 60 000 — 100 000 microsfere [45, 46]. Evitarea administrării unui număr inutil de mare de particule ca și utilizarea unor preparate adecvate (MSAU cu diametrul de $13 \pm 1{,}5$ μm) alături de indicația judicioasă a explorării sînt elemente ce contribuie la minimalizarea riscului investigațional prin PRF—PP.

4.2. RADIOFARMACEUTICE DE INHALARE CA AEROSOLI

PRF utilizate în scintigrafia pulmonară de inhalare cu aerosoli își îndeplinesc atributele diagnostice în funcție de proprietățile lor fizico-chimice ce le condiționează comportarea în fluxul gazos normal sau patologic de-a lungul căilor respiratorii. Vizualizarea diagnostică prin impregnarea bronho-pulmonară de inhalare este rezultanta condițiilor de aerosolizare a unui PRF adecvat, corelate cu funcția ventilatorie a subiectului investigat [47].

Factorul esențial ce determină retenția și distribuția aerosolilor la diferite nivele de-a lungul căilor respiratorii ale subiectului normal este reprezentat de dimensiunea particulelor nebulizate [48, 49]. Căile aeriene superioare rețin particulele mai mari de 10 μm; traheii și bronhiilor principale le revin dimensiunile 2 — 10 μm, iar bronhiile secundare rețin majoritatea particulelor de 2 μm.

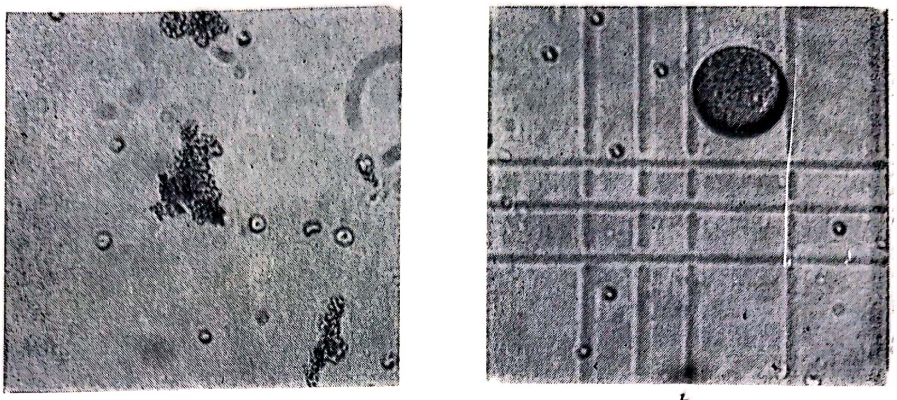
Numai aerosolii cu dimensiuni mai mici de 2 μm pătrund endoalveolar, dar un procent relativ redus este reținut întrucît cel mai important procent este preluat de fluxul expirator; particulele mai mici de 0,1 μm se comportă asemănător gazelor fiind practic exhalate în totalitate [50].

În lumina acestor date cerințele PRF utilizat pentru scintigrafia pulmonară de inhalare cu aerosoli pot fi conturate astfel:

— marcaj cu radionuclid adecvat vizualizării de emisie;
— produs aerosolizabil la dimensiuni de 0,5 — 4 μm, în condiții reproductibile;
— absența efectelor iritative traheo-bronșice sau alveolare;
— absența absorbției endobronșice sau endoalveolare;
— eliminarea predominantă prin mecanism muco-ciliar;
— iradiere redusă.

Aceste cerințe sînt parțial sau total îndeplinite de PRF folosite și în alte domenii ale medicinii nucleare. Dintre PRF marcate cu ^{99m}Tc sînt utilizate: soluția de serumalbumină umană [51], soluția de sulfocoloid [52], soluția coloidală de fitat [53], iar ca produse destinate în mod particular acestei investigații, suspensia de milimicrosfere [49] și pulverea de lactoză — $SnCl_2$ [54]. În ceea ce privește PRF marcate cu ^{113m}In și-au găsit utilizare și în acest domeniu soluțiile coloidale, soluția de In-transferină, iar recent s-au descris țigări marcate cu ^{113m}In [50, 55]. Diversitatea produselor utilizate se explică prin faptul că, odată îndeplinite condițiile

Scanned with OKEN Scanner



a *b*

Fig. 4.2. — Aspectul microscopic al (*a*) MAA și (*b*) MASU; pentru comparația dimensională în preparatul microscopic au fost incluse eritrocite umane normale.

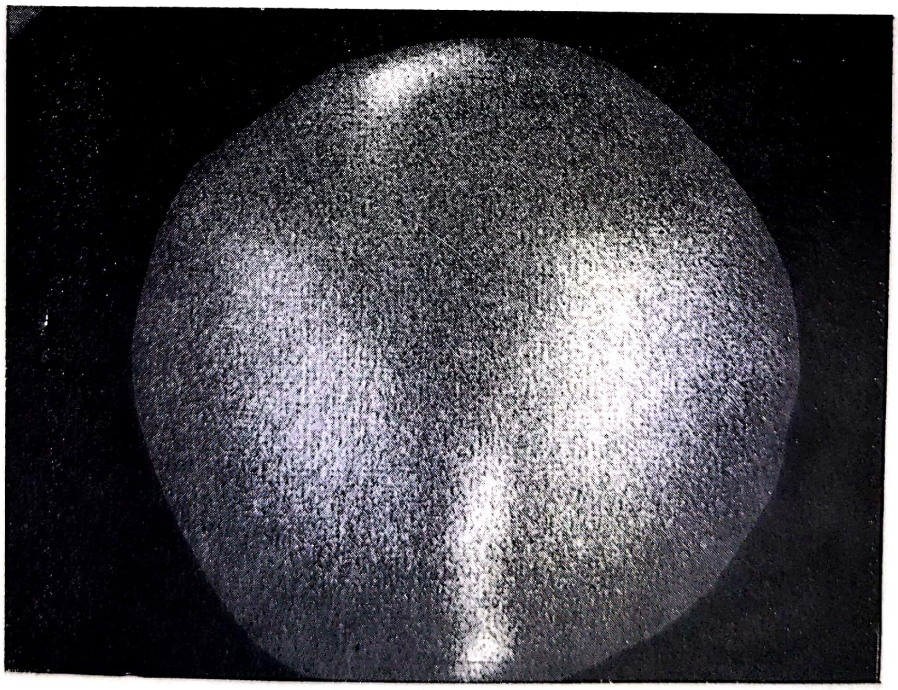


Fig. 4.3. — Scintigrafie pulmonară de inhalare cu aerosoli de ^{99m}Tc-sulfocoloid; vizualizarea ariilor pulmonare și a traheii.

Scanned with OKEN Scanner

radiofarmaceuticului de inhalare, esenţială devine realizarea aerosolizării adecvate în timp ce farmacocinetica biochimică a compusului rămîne pe plan secundar.

Aparatura şi tehnica folosită pentru nebulizare condiţionează decisiv asigurarea dimensiunilor adecvate ale particulelor ca şi reproductibilitatea metodei [54, 56].

La subiecţii normali aerosolizarea unui volum de 8—12 ml soluţie radiofarmaceutic în ritmul de 1 ml/minut duce la acumularea bronho-pulmonară liniară a produsului [57]. Din activitatea nebulizată se reţine în medie în arborele bronho-alveolar cca. 10%, restul radioactivităţii fiind exhalată în cursul procedurii de aerosolizare; o parte din activitate se regăseşte la nivelul stomacului, prin deglutiţia particulelor depuse faringian [48, 51, 55].

Impregnarea tractului respirator normal cu aerosoli este rezultanta a 4 mecanisme: impact gravitaţional, turbulenţă, sedimentare şi difuzie; primele două mecanisme intră în acţiune la nivelul căilor respiratorii superioare, traheii şi bronhiilor mari, în timp ce sedimentarea şi difuzia se petrec în bronşiolele terminale şi alveole [50]. La subiecţii normali, scintigrafia de inhalare cu aerosoli duce la vizualizări pulmonare asemănătoare celor de perfuzie, la care se adaugă imaginea traheală şi a bronşiilor primare (fig. 4.2).

În cazurile în care fluxul aerian bronşic este disturbat (obstrucţie bronşică totală sau parţială, zone de bronşectazie cu flux lent) se accentuează în mod patologic procesele de impact şi turbulenţă avînd drept rezultat depunerea excesivă a aerosolilor în zonele afectate şi absenţa lor în zonele distale teritoriului bronşic obstruat.

În acest fel depunerea şi retenţia aerosolilor radioactivi obiectivizează scintigrafic atît obstrucţiile bronşice cît şi zonele cu deficit ventilator [55].

Trebuie însă subliniat faptul că scintigrafia de inhalare cu aerosoli informează asupra permeabilităţii şi fluxului în căile aeriene fără a reprezenta o determinare de ventilaţie regională [58].

4.3. GAZELE RADIOACTIVE

Introducerea gazelor radioactive în explorarea pneumologică a dus la dezvoltarea unor tehnici neinvazive de investigare funcţională pulmonară regională. Din punct de vedere fiziologic deosebim două grupe de gaze radioactive utilizate în investigaţia bronho-pulmonară [59]:

1) gaze cu solubilitate sanguină ridicată: $^{15}O_2$, $^{11}CO_2$;

2) gaze cu solubilitate sanguină redusă: $^{13}N_2$, radioxenonul şi radiokriptonul.

4.3.1. GAZE CU SOLUBILITATE SANGUINĂ RIDICATĂ

Sînt radioizotopi ai unor gaze ce intervin în mod fiziologic în procesul respirator, deci ar oferi premise biologice ideale pentru utilizarea drept radiotrasori.

Scanned with OKEN Scanner

^{15}O — are $T_{1/2}$ fizic de 2,1 minute, emite pozitroni (și implicit radiații γ cu energie de 511 keV) fiind produs însă exclusiv prin reacții nucleare realizate la ciclotron [60].

^{11}C — are $T_{1/2}$ fizic de 20,4 minute, același tip de emisie ca și ^{15}O, fiind de asemenea produs exclusiv de ciclotron. Prelucrarea radiochimică imediată a ^{11}C în condițiile amintite mai sus permite administrarea inhalatorie la pacienți fie a $^{11}CO_2$, fie a ^{11}CO [61].

Datele de fiziologie clasică existentă fac inutilă descrierea comportării $^{15}O_2$ și $C^{15}O_2$ sau $^{11}CO_2$ și ^{11}CO după administrarea lor inhalatorie. Necesită însă a fi subliniat faptul că ^{15}O inhalat sub formă de $C^{15}O_2$ este transferat rapid *in vivo* moleculei de H_2O, cu producerea $H_2\,^{15}O$ care marchează apa interstițială pulmonară [62, 63].

Gazele solubile administrate inhalator, în special $^{15}O_2$ și $^{11}CO_2$, sînt folosite pentru investigarea distribuției regionale a ventilației dar mai ales pentru urmărirea schimburilor gazoase și perfuziei regionale. Într-adevăr, marea lor solubilitate sanguină face ca procesul de inhalare, respectiv distribuția regională să fie succedată instantaneu de preluarea sanguină a gazului inspirat astfel încît curba dispariției pulmonare după inspir unic + apnee este reprezentativă pentru irigația alveolară [64].

Utilizarea diagnostică a gazelor marcate cu ^{11}C și ^{15}O este accesibilă numai instituțiilor spitalicești care dispun de ciclotroane proprii. Deși numărul ciclotroanelor de uz exclusiv medical, din lume, a crescut de la 8 în 1970 [61] la 18 în 1976 [65] folosirea gazelor radioactive solubile în investigarea respiratorie rămîne o metodologie de excepție și ca atare spațiul acordat acestor radioprodușI în prezenta lucrare este foarte limitat.

4.3.2. GAZE CU SOLUBILITATE SANGUINĂ REDUSĂ

Gazele cu solubilitate sanguină redusă, în special radioizotopii xenonului, cunosc o utilizare diagnostică crescîndă, determinată de versatilitatea și eficiența lor în investigarea pneumologică.

^{133}Xenonului i s-au alăturat în ultimii ani alți radionuclizi ai Xe; caracteristicile fizice ale principalelor gaze radioactive cu solubilitate sanguină redusă folosite în prezent în medicina nucleară sînt sintetizate în tabela 4.3.

TABELA 4.3

Caracteristicile fizice ale principalelor gaze radioactive greu solubile utilizate în medicina nucleară [63]

Nr. crt.	Gazul radioactiv	$T_{1/2}$ fizic	Energia principalilor fotoni keV	Coef. de solubilitate Bunsen	
				H_2O 20°C	Lipide 22°C
1	Azot-13	10 min.	511	0,015	0,052
2	Xenon-125	17,2 ore	188	0,123	1,9
			243		
3	Xenon-127	36,4 zile	172		
			203		
4	Xenon-133	5,3 zile	80		
5	Xenon-135	9,2 ore	250		
6	Kripton-85m	4,4 ore	150		
			305	0,062	0,44

Scanned with OKEN Scanner

Radioizotopii xenonului constituie gazele cu cea mai largă utilizare în medicina nucleară; biocinetica lor este funcție de calea de administrare, respectiv respirarea de gaz radioactiv sau injectarea intravenoasă a unei soluții saline izotone saturată cu radioxenon.

4.3.2.1. **Biocinetica radioxenonului administrat pe cale respiratorie.** Lucrarea de referință privind sistematizarea dinamicii radioxenonului inhalat rămîne publicația lui Matthews și colab. [67] în care se disting cinci etape ale biocineticii gazului. În linii generale, aceste etape se regăsesc în rezultatele recent publicate de Susskind și colab. [68] privind epurarea ^{127}Xe din organismul uman, proces caracterizat printr-o curbă pentaexponențială.

Etapa I — distribuția intrapulmonară a gazului administrat respirator — reprezintă în cadrul biocineticii radiotrasorului momentul esențial pe planul semnificației diagnostice clinice.

Distribuția intrapulmonară a aerului ventilat este neuniformă în mod fiziologic întrucît spațiile aerifere nu au toate aceeași expansiune inspiratorie [69]. Distribuția neuniformă *temporală* se explică prin faptul că teritoriile alveolare aferente căilor aeriene mai înguste își efectuează schimburile ventilatorii mai lent, spre deosebire de cele aferente conductelor mai largi ce realizează mai rapid schimburile gazoase. Distribuția neuniformă *spațială* este explicată prin existența unor rații de expansiune inspiratorii (raportul dintre volumul inițial și cel final) diferite funcție de nivelul topografic pulmonar considerat. Neuniformitatea fiziologică de distribuție se modifică calitativ și cantitativ în condiții fiziopatologice constituind un important element de diagnostic funcțional.

Radioizotopii xenonului administrați pe cale respiratorie constituie indicatori valoroși pentru investigarea distribuției intrapulmonare permițînd cuantificarea neuniformității spațiale și temporale. Folosind mijloace adecvate de detecție și măsurare externă a radiațiilor γ, distribuția și cinetica intrapulmonară a radioxenonului pot fi urmărite prin diverse tehnici de administrare respiratorie. Tehnicile de impregnare radioactivă pulmonară inhalatorie constau fie într-o inspirație unică urmată de apnee, fie în urmărirea curbei de impregnare pulmonară inspiratorie prin ventilarea subiectului cu radioxenon — aer atmosferic în circuit închis (Wash-in = = W.I.). Alt grup de tehnici stabilesc distribuția prin monitorizarea curbelor de epurare expiratorie a trasorului (Washout expirator = W.O.E.) din pulmonii în prealabil ventilați la echilibru cu radioxenon + aer atmosferic. Aparatura utilizată explorează de obicei 3—4 cîmpuri topografice la nivelul fiecărui plămîn, notate convențional cu I—IV de la apex către baze.

Diferite modalități de prezentare a rezultatelor investigațiilor funcționale de acest gen exprimă în fapt variate fațete ale biocineticii de distribuție regională intrapulmonară a radioxenonului [70 — 72].

Etapa a II-a este reprezentată de *clearance-ul alveolar* definit drept „fracțiunea de radioactivitate din aerul alveolar preluată de către sînge, pe unitate de timp, în apnee" [67].

Intensitatea procesului fiind funcție de solubilitatea sanguină a gazului (redusă pentru xenon) este scăzută dar nu lipsită de importanță. În cazul tehnicii inspirației unice + apnee de 10 sec., clearance-ul alveolar al Xe poate fi neglijat; pentru tehnica de W.I. cînd subiectul respiră timp de cîteva minute gazul radioactiv, clearance-ul alveolar devine semnificativ și are implicații în tehnologia diagnosticului funcțional.

Etapa a III-a, *clearance-ul sanguin*, constă în fracţiunea de radioactivitate în sînge + ţesut preluată din regiunea considerată pe unitate de timp [67]. Deşi radioxenonul se echilibrează rapid la nivelul spaţiilor tisulare, clearance-ul sanguin este redus la nivelul plămînilor, factorul limitativ fiind clearance-ul alveolelor scăzut.

Etapele IV şi V sînt reprezentate de *schimbul radioxenonului sanguin cu ţesuturile* şi respectiv, de *întoarcerea venoasă a radioxenonului*. Difuzia radioxenonului în ţesuturi este instantanee, distribuţia sa tisulară fiind determinată de perfuzia ţesutului şi de valoarea coeficientului de repartiţie (λ) ţesut/sînge (vezi § 5.3.1.1.). Datele lui Matthews şi Dollery [67] sugerează existenţa a două fonduri metabolice tisulare, unul de 30—40 l cu o irigaţie de 2,5 — 4,4 l/min şi altul de 0,3 — 2 litri cu irigaţie de 2,4 l/min ; ele ar putea corespunde cu un pool visceral avînd viteză de schimb rapidă şi, respectiv, un pool constînd din musculatură şi piele, avînd viteză de schimb mai lentă. Prin urmărirea radioantropometrică a desaturării organismului de ^{127}Xe [68] se identifică însă numai o singură componentă avînd $T_{1/2}$ de $0,4 \pm 0,14$ ore corespunzînd muşchilor în repaus şi ţesuturilor slabe ale organismului.

Comportarea radioxenonului la nivelul compartimentului adipos este particulară ţinînd seama de valoarea 8 a coeficientului λ, ponderată însă prin perfuzia scăzută a ţesutului gras.

Etapele II—V din biocinetica radioxenonului administrat respirator au implicaţii în explorarea funcţională respiratorie întrucît gazul radioactiv ajuns în ţesuturiie toracice extrapulmonare poate reprezenta un factor perturbator în detecţia şi măsurarea externă a proceselor intrapulmonare. Acest fenomen neglijabil în tehnica inspirului unic, este de discutat pentru tehnicile de W.I. şi de epurare expiratorie cînd fondul tisular toracic extrapulmonar atinge valori de 2% din cele ale pulmonului ventilat [70]. Excluderea acestui posibil factor perturbator se realizează prin corecţii de fond tisular luîndu-se ca zonă de referinţă o regiune situată infrapulmonar, pe linia mediană [72]. Un factor posibil de eroare, rezultînd din biocinetica xenonului şi interferînd determinarea ventilaţiei pulmonare bazale drepte, este realizat de localizarea hepatică a gazului radioactiv inhalat, proces mai accentuat la obezi, diabetici sau bolnavii cu degenerescenţă grasă hepatică [73].

4.3.2.2. **Biocinetica radioxenonului administrat pe cale intravenoasă.** Constituind o parte integrantă a investigaţiei funcţionale respiratorii cu gaze radioactive, administrarea intravenoasă a unei soluţii saline izotone saturată cu radioxenon permite explorarea perfuziei pulmonare şi a epurării expiratorii de perfuzie (perfused wash-out = W.O.P.) Soluţia de radioxenon injectată intravenos ajunge la nivelul patului capilar alveolar unde datorită solubilităţii sanguine scăzută a Xe, un procent de peste 95% din radioactivitatea injectată difuzează în aerul alveolar ; se realizează o distribuţie pulmonară a radioxenonului ce exprimă irigaţia capilară regională pulmonară. West şi colab. [64] au demonstrat existenţa unui model trizonal de distribuţie pulmonară a radioxenonului administrat intravenos, arătînd dependenţa irigaţiei pulmonare de presiunile în artera şi vena pulmonară ca şi de presiunea alveolară. Primele două presiuni cresc treptat apexo-bazal datorită efectului hidrostatic în timp ce a treia este constantă ; la subiectul normal în ortostatism perfuzia pulmonară se reduce deci treptat de la baze către vîrfuri.

Radioxenonul ajuns pe cale vasculară în interiorul alveolelor este epurat prin expirație, proces ce stă la baza investigării W.O.P., indice regional ce măsoară ventilația alveolară dar numai la nivelul zonelor perfuzate.

Administrarea intravenoasă a radioxenonului poate fi combinată în diferite modalități cu cea ventilatorie, oferind multiple modalități metodologice de investigare în pneumologie [29, 74] între care se detașează prin valoare și unicitate vizualizările funcționale pulmonare [75, 76].

Condiționare — manipulare. Starea gazoasă de agregare a radioxenonului obligă la condiționări radiofarmaceutice speciale care permit administrarea ventilatorie sau intravenoasă a produsului în condiții de iradiere și contaminare minimă. Au fost descrise numeroase dispozitive și tehnici pentru porționarea și administrarea gazului radioactiv în circuit închis, pentru prepararea soluțiilor saturate de xenon ca și pentru efectuarea investigațiilor în condiții optime de radioprotecție [77, 78].

Sînt de subliniat două aspecte particulare : adsorbția și contaminarea crescută a soluțiilor saline de ^{133}Xe pe materialele plastice (inclusiv seringi), precum și adsorbția considerabilă a radioxenonului pe cauciuc, putîndu-se ajunge pentru dopurile flacoanelor la adsorbția a 40% din radioactivitatea soluțiilor conținute în interiorul lor [63].

Iradiere — efecte secundare. Goddard și Ackery [79] calculează dozele de iradiere comparativă produse de ^{133}Xe, ^{127}Xe și ^{125}Xe de-a lungul unei investigații pulmonare complete ; parametrii ca și modalitatea de calcul sînt detaliați în lucrarea menționată.

^{127}Xe și ^{125}Xe produc iradieri mai reduse ale mucoasei căilor respiratorii (150 și respectiv 250 m rad/investigație) comparativ cu ^{133}Xe care însumează 1160 mrad/investigație. Diferențele de iradiere/investigație sînt mai reduse pentru plămîni (^{127}Xe — 44 mrad, ^{125}Xe — 46 mrad, ^{133}Xe — 108 mrad), iar iradierea gonadică este practic identică (respectiv 6 mrad, 8 mrad și 6 mrad.) De remarcat că ^{125}Xe se dezintegrează la ^{125}I care rămas în organism adaugă o iradiere tiroidiană suplimentară de 1500 rad/investigație în cazul folosirii acestui radioxenon.

Datele de mai sus sînt orientative, iradierea calculată variind după autori funcție de etapele de explorare considerate, concentrația gazului radioactiv și activitățile administrate, constante biocinetice luate în calcul ș.a.m.d [66, 67, 74, 78].

Inspirat în concentrații mari xenonul poate avea efecte narcotice [80]; la concentrațiile de radioxenon utilizate în medicina nucleară aceste efecte secundare nu au fost niciodată semnalate.

Deși ^{127}Xe se dovedește superior față de ^{133}Xe atît din punct de vedere radiobiologic cît și pe planul tehnologiei de detecție — vizualizare [61, 81] aplicarea sa în practica diagnostică se dovedește încă irealizabilă întrucît producția ^{127}Xe rămîne apanajul ciclotroanelor de mare putere.

^{125}Xe de asemenea are unele caracteristici fizice de emisie avantajoase față de ^{133}Xe, iar producția sa la ciclotron este mai puțin costisitoare decît a ^{127}Xe ; inconvenientele ^{125}Xe sînt reprezentate însă de viața fizică scurtă și de dezintegrarea în ^{125}I care conduce la creșterea iradierii tiroidiene [66].

Considerentele de mai sus explică de ce ^{133}Xe, cu toate servituțile unei energii γ considerată inadecvată detecției externe cu actualele mijloace ale medicinii nucleare, rămîne în prezent gazul radioactiv cu cea mai largă utilizare diagnostică.

4.4. INDICAȚIILE UTILIZĂRII RADIOFARMACEUTICELOR ÎN EXPLORAREA PNEUMOLOGICĂ

Principalele afecțiuni în care utilizarea PRF poate fi decisivă pentru stabilirea diagnosticului pozitiv, elaborarea bilanțului funcțional complex sau orientarea riguroasă a atitudinii terapeutice sînt embolia pulmonară, cancerul pulmonar și bronhopneumopatia obstructivă cronică [28, 29, 48, 51, 74, 82, 83].

Un grup mult mai larg de afecțiuni pneumologice beneficiază de aportul PRF, dar uneori contribuția lor efectivă la rezolvarea unor probleme de interes clinic real este evident mai modestă.

Embolia pulmonară a devenit datorită PRF—PP o afecțiune curent accesibilă diagnosticului obiectiv de certitudine. Scintigrafia pulmonară de perfuzie, în care MAA-^{99m}Tc și MSA-^{99m}Tc sînt actualmente PRF de elecție, aduce clinicianului următoarele elemente:

— atestarea existenței unui defect de perfuzie pulmonară,

— stabilirea sediului și mărimii acestui defect de perfuzie (întregul plămîn, lob, segment),

— evoluția spontană și/sau sub tratament.

Unele dificultăți diagnostice pot fi depășite adăugînd la investigarea perfuziei cu PRF—PP și explorarea ventilației cu radioxenon; cînd defectul de perfuzie este însoțit de ventilație normală sau aproape normală diagnosticul de embolie pulmonară se apropie de certitudine. Radiofarmaceuticele de aerosolizare pot da elemente diagnostice identice atunci cînd demonstrează penetrația soluției nebulizate la nivelul zonei ischemice.

Cancerul bronho-pulmonar primitiv este diagnosticat pozitiv pe date clinice, radiologice, bronhoscopice și morfopatologice. Contribuția PRF—PP se concretizează în obiectivizarea defectelor de irigație arterială pulmonară a căror extensie este deseori corelată cu gradul de interesare tumorală a hilului. Hipoxia regională prin compresie tumorală bronșică poate produce reflex zone cu deficit de irigație. În general tulburările vasculare mai importante obiectivizabile prin PRF—PP corespund unor localizări proximale ale procesului malign.

Scintigrafia bronho-alveolară cu aerosoli ajută uneori la localizarea afectării bronșice și la aprecierea gradului de permeabilitate al acesteia. Pe plan etiologic PRF oncotrope (^{67}Ga citrat și radiobleomicina) pot fi utile în diagnosticul diferențial.

În practică contribuția PRF nu este decisivă pentru diagnosticul pozitiv ci pentru precizarea extensiei afecțiunii și răsunetului ei funcțional adică în elaborarea bilanțului necesar stabilirii indicației de exereză sau oncoterapiei nechirurgicale.

Cancerele pulmonare secundare produc de obicei modificări vasculare mai puțin importante, deși studii efectuate cu ^{133}Xe relevă defecte de ventilație și irigație în vecinătatea maselor tumorale [83].

Bronhopneumopatia obstructivă cronică (BPOC) beneficiază de aportul diagnosticului funcțional complex efectuat cu radioxenon ca și de radiofarmaceuticele administrate prin aerosolizare [84]. Acestea din urmă pot fi un indicator mai sensibil decît alte explorări funcționale clasice întrucît evidențiază modificări incipiente ale fluxului aerian bronșic; se descrie o acumulare centrală (hilară) a aerosolilor în tipul emfizematos de BPOC și acumulări multifocale situate în plin parenchim pentru tipul bronșitic cronic de BPOC.

Scanned with OKEN Scanner

Radiofarmaceuticele își găsesc utilizare și în investigarea supurațiilor pulmonare, a tuberculozei pulmonare, în pneumoconioze, afecțiuni ale micii circulații etc., dar aportul lor diagnostic în aceste cazuri, deși deseori valoros, este totuși rareori decisiv.

BIBLIOGRAFIE

1. G.V. Taplin, D.E. Johnson, în „Medical Radioisotope Scanning", vol. 2, p. 3, IAEA, Vienna, 1964.
2. H.N. Wagner Jr., B.A. Rhodes, *Investigative Radiology*, **4**, 374 (1969).
3. D.E. Tow, H.N. Wagner și colab., *Amer. J. Roentgen. Radium Ther. Nucl. Med.*, **96**, 664 (1966).
4. S.R. Kaihara, P.D. van Heerden și colab., *J. Appl. Physiol.*, **25**, 696 (1968).
5. H.R. Shibata, L.D.Mc Lean, „Blood flow in tumors" în „Progress in Clinical Medicine", p. 33, I.M. Ariel Ed., 1966.
6. M.A. Davis, în „Radiopharmaceuticals", Soc. of Nucl. Med., New York, 1975, p. 267.
7. G.V. Taplin, D.E. Johnson și colab., cap. 29, p. 525, în „Radioactive Pharmaceuticals, USAEC, Oak Ridge, 1966.
8. T. Muller, Andersen, în „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", vol. 2, p. 77, IAEA, Vienna, 1973.
9. E.D. Furth, A.J. Okinaka, *J. Nucl. Med.*, **6**, 506 (1965).
10. F.H. De Land, *J. Nucl. Med.*, **7**, 883 (1966).
11. P. de Vernejoul, F. Ruff și colab., *Press Med.*, **75**, 2757 (1967).
12. L.A. Monroe, W.L. Thompson și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 192 (1974).
13. T. Honda, I. Kazem și colab., *J. Nucl. Med.*, **11**, 580 (1970).
14. H.S. Stern, D.A. Goodwin și colab., *Nucleonics*, **24**, 57 (1966).
15. Y. Yano, J. McRae și colab., *J. Nucl. Med.*, **10**, 683 (1969).
16. N.A. Davis, *J. Nucl. Med.*, **11**, 313 (1970).
17. F.P. Bruno, V.A. Brookeman și colab., *J. Nucl. Med.*, **11**, 134 (1970).
18. S.L. Barker, E. A, Gusmano și colab., *J. Nucl. Med.*, **12**, 5 (1971)
19. D.A. Goodwin, *J. Nucl. Med.*, **12**, 580 (1971).
20. R.S. Watts, R.L. Sopher, H.G. Pena, *J. Nucl. Med.*, **15**, 616 (1974).
21. M.A. Davis, în „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", vol. 2, p. 43. IAEA, Vienna, 1973.
22. B.A. Rhodes, I. Zolle și colab., *Radiology*, **92**, 1453 (1969).
23. T.F. Bolles, D.O. Kubiatowicz și colab., „Radiopharmaceuticals and labelled compunds", vol. 1, p. 151, IAEA, Vienna, 1973.
24. J.G. Mc Afee, G. Subbramanian, în „Clinical scintillation imaging", Grune and Stratton Inc., New York, 1975.
25. J.A. Burdine, L.A. Ryder, R.E. Sonnemaker, *J. Nucl. Med.*, **12**, 127 (1971).
26. J. Szymendera, O. Mioduszewska și colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 478 (1977).
27. W.B. Nelp, „Medical radionuclides radiation dose and effects", p. 239, USAEC, Oak Ridge, 1970.
28. R.H. Secker-Walker, B.A. Siegel, Radiologic Clinics of North America (1973) **XI**, 215.
29. G.L. de Nardo, S. J. De Nardo, The lung Cap. 11, p. 461, în „Clinical scintillation imaging", Grune and Stratton Inc., New York, 1975.
30. C. Anastasatu, A. Brăileanu, T.Pop, „Scintigrafia pulmonară", Edit. medicală, București, 1970.
31. B.A. Rhodes, M.S. Stern, J.W. Buchanan, *Radiology*, **99**, 613 (1971).
32. D.R. Allen, W.B. Nelp și colab., în „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", vol. 2, p. 37, IAEA, 1973.
33. F.S. Mishkin, R.E. Brasmear, *J. Nucl. Med.*, **12**, 251 (1971).
34. R.A. Rhodes, F.T. Bolles, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 282.
35. M.A. Davis, G.M. Frieswick, A. Mandelstam, *J. Nucl. Med.*, **18**, 627 (1977).
36. J. Szymendera, O. Mioduszewska și colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 478 (1977).
37. J. Szymendera, O. Mioduszewska și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 17 (1974).
38. M.A. Davis, M.F. King, *J. Nucl. Med.*, **15**, 436 (1974).
39. P.C. Stang, J.F. Roelands, P. Cohen, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 292.
40. A.J. Bliek, J.E. Bachynski, *J. Nucl. Med.*, **12**, 90 (1971).
41. R.L. Littenbarg, *J. Nucl. Med.*, **16**, 236 (1975).

Scanned with OKEN Scanner

42. W.R. Vincent, S.J. Goldberg, D. Desilets, *Radiology*, **91**, 1181 (1968).
43. H.J. Roberts, *Angiology*, **21**, 270 (1970).
44. J.O. William, *Br. J. Radiol.*, **47**, 61 (1974).
45. E.S. Williams, *Br. J. Radiol.*, **47**, 54 (1974).
46. H.J. Dworkin, R.F. Gutkowski, *J. Nucl. Med.*, **18**, 260 (1977).
47. H. Itoh, Y. Ishii și colab., Proc. First World Congr. Nuc,. Med., p. 1101, Tokyo — Kyoto oct. 1974.
48. N.D. Poe, G.V. Taplin, „Pulmonary scanning", în W.H. Bland, „Nuclear medicine", cap. 12, p. 332, ed. a II-a, Mc Graw Hill Book Co., New York, 1971.
49. C. Giuntini, R. Pasqualini și colab., „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", vol. 2, p. 65, IAEA, Vienna, 1973.
50. L. Ramanna, D.P. Tashkin și colab., *Chest*, **68**, 634 (1975).
51. G.V. Raplin, N.D. Poe și colab., „Medical Radioisotope Scintigraphy", vol. 2, p. 111, IAEA, Vienna, 1969.
52. F.J. Pircher, „Medical Radioisotope Scintigraphy", vol. 2, p. 131, IAEA, Vienna, 1969.
53. A.T. Isitman, T. Manoli și colab., *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, **120**, 776 (1974).
54. G.V. Taplin, D. Elam și colab., „Proc. First World Congr. Nucl. Med.", Tokyo-Kyoto, 1974, p. 270.
55. G.V. Taplin, N.D. Poe, T. Isawa, în „Radiopharmaceuticals", Soc. of Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 305.
56. R.D. Wasnich, *J. Nucl. Med.*, **17**, 707 (1976).
57. R. Gongora, M. Roy și colab., în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", p. 857, IAEA, Vienna, 1971.
58. H.W. Knipping, W. Bolt, H. Valentin și colab., *Münch. Med. Wochenschrift*, **99**, 1 (1957).
59. J.B. West, „Medical Monograph 1", The Radiochemical Centre, Amersham, 1966.
60. J.C. Clark, C.M.E. Matthews și colab., Nucleonics, **25**, 54 (1967).
61. H.I. Glass, D.J. Silvester, *Br. J. Radiol.*, **43**, 589 (1970).
62. B. Hoop, J.S. Laughlin, R.S. Tilbury, „Cyclotrons in nuclear medicine", cap. 12, în „Instrumentation in nuclear medicine", vol. 2, Academic Press, New York, 1974.
63. R.A. Ponto, M.E. Loken, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 296.
64. J. B. West, „Radionuklide in Kreislaufforschung und Kreislaufdiagnostik", F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 1968, p. 73.
65. A.P. Wolf, „Medical cyclotrons", în „Medical radionuclide imaging", vol. 1, p. 343, IAEA, Vienna, 1977.
66. M.H. Hines, N.F. Peek și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 143 (1975).
67. C.M.E. Matthews, C.T. Dollery și colab., în „Radioactive pharmaceuticals", cap. 31, p. 567, USAEC, Oak Ridge, 1966.
68. S. Susskind, H.L. Atkins și colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 462 (1977).
69. St. Duțu, „Explorarea paraclinică a aparatului respirator", în „Explorarea paraclinică", cap. 1, p. 17, Edit. medicală, București, 1970.
70. W.C. Ball, P.B. Stewart și colab., *J. Clin. Invest.*, **41**, 519 (1962).
71. J.M. Miller, A. Khalil, C.D. Howe, *American review of respiratory disease*, **101**, 218 (1970).
72. R.H. Secker-Walker, I.R. Hill și colab., *J. Nucl. Med.*, **14**, 725 (1973).
73. J.E. Carey, J.M. Purdy, D.C. Moses, *J. Nucl. Med.*, **15**, 1179 (1974).
74. A. Bru, M. Jourde, J.P. Besombes, „Poumons", în „Traité de Médecine Nucléaire", vol. 2, cap. 6, p. 115, Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1975.
75. T.J. Natarajan, H.N. Wagner Jr., în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", vol. 2, p. 357, IAEA, Vienna, 1975.
76. N.M. Alpert, K.A. Mc Kusick și colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 88 (1976).
77. J.D. Pearson „Dispensing and handling of ^{133}Xe", în E.H. Belcher, N. Vetter, „Radioisotopes in Medical Diagnosis", Butterworths, London, 1971.
78. M.K. Loken, G.S. Kush, în „Medical Radionuclides iradiation dose and effects", p. 253, USAEC, Oak Ridge, 1970.
79. B.A. Goddard, D.M. Ackery, *J. Nucl. Med.*, **16**, 780 (1975).
80. S.S. Kety, *Pharmacol. Rev.*, **3**, 1 (1951).
81. G. Coates, C. Nahmias, *J. Nucl. Med.*, **18**, 221 (1977).
82. R.H. Secker-Walker, Lung scanning, cap. 32, p. 341, în „Diagnostic nuclear medicine", Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1976.
83. K.M. Ali, C.D. Mowe, J.M. Miller, *Cancer*, **27**, 460 (1971).
84. V. Fica, D. Olteanu, Gh. Georgescu și colab., *Med. Int.*, **29**, 213 (1977).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

UTILIZAREA RADIOFARMACEUTICELOR ÎN EXPLORAREA CARDIO-VASCULARĂ

Locul deţinut de afecţiunile cardio-vasculare în cadrul patologiei contemporane justifică eforturile dirijate şi sistematice ce se concentrează asupra realizării unui diagnostic precoce şi exact al acestora, problematică în care se înscrie şi găsirea unor PRF adecvate exploatărilor de medicină nucleară. PRF existente pot fi ordonate în trei grupe principale, după destinaţia investigaţiei:

I) PRF destinate investigaţiei irigării miocardice.

II) PRF de obiectivizare a proceselor trombotice intravasculare.

III) PRF destinate investigării hemodinamicii sistemice şi loco-regionale.

Clasificarea, fără a fi riguroasă pe plan fiziopatologic întrucît cele trei grupe au domenii largi de suprapunere, are avantajul sublinierii destinaţiei de utilizare diagnostică a PRF.

5.1. RADIOFARMACEUTICE DESTINATE INVESTIGĂRII IRIGAŢIEI MIOCARDICE

Domeniu de interes teoretic şi practic imediat, care se orientează către evidenţierea modificărilor de irigaţie miocardică, plecînd de la vizualizarea ariilor de infarct miocardic acut şi mergînd pînă la obiectivizarea diferitelor grade ale insuficienţei coronariene cronice.

Deosebim:

A. PRF cu tropism pozitiv pentru miocardul normal irigat, produse ce realizează imagini negative în vizualizarea infarctului miocardic;

B. PRF cu tropism pozitiv pentru miocardul ischemic, produse ce realizează imagini pozitive în vizualizarea infarctului miocardic.

5.1.1. RADIOFARMACEUTICE CU TROPISM POZITIV PENTRU MIOCARDUL NORMAL IRIGAT

PRF din acest grup au fost clasificate de Poe [1] în:

— trasori inerţi metabolic, cu difuziune rapidă: radioxenonul, radiokriptonul, antipirina radioiodată;

— trasori cu extracţie completă, fără dependenţă de metabolismul celular: macroagregate şi microsfere radioactive;

Scanned with OKEN Scanner

— trasori nemetabolizabili, citodependenți, cu extracție miocardică importantă: ionii radioactivi ai potasiului, cesiului, rubidiului și taliului;

— trasori metabolizabili, citodependenți, cu extracție miocardică importantă: ^{13}N-amoniu, ^{11}C-norepinefrina, acidul oleic radioiodat, ^{18}F-etanolul.

Întrucît utilizarea trasorilor din primele două grupe are un caracter mai general în investigarea cardio-vasculară ei vor fi tratați în cadrul PRF destinate investigării hemodinamicii sistemice și loco-regionale.

5.1.1.1. **Trasorii nemetabolizabili, citodependenți, cu extracție miocardică importantă.** Ocupă o pondere crescîndă în investigarea miocardică.

A. Elemente de farmacocinetică. Cuprind $^{43}K^+$ și bioanalogii acestuia (^{81}Rb, ^{129}Cs, ^{201}Tl) grup cu pondere atît în investigarea cantitativă a fluxului sanguin coronarian cît mai ales în tehnicile recente de vizualizare miocardică. După administrare intravenoasă radiopotasiul și bioanalogii săi sînt extrași din circulație de către miocard, mușchi scheletici, rinichi, ficat etc., proporțional cu distribuția debitului cardiac la nivelul acestor organe. Extracția la nivelul organelor este importantă, dar incompletă și variază pentru diferiți radioioni considerați. Se produce apoi o redistribuire a trasorului cu echilibrarea lui extra- și intracelulară conformă cu gradientele fiziologice sau patologice.

Acumularea miocardică a trasorilor ca și raportul radioactivitate miocardică/radioactivitate fond tisular țin de aceste procese dinamice complexe [1].

Clearance sanguin. Epurarea sanguină a acestui grup de radiofarmaceutice este în general rapidă, cu unele diferențe în ratele de clearance.

Dispariția sanguină se face biexponențial, componenta rapidă exprimînd fixarea în organe; componenta lentă are o pondere modestă contribuind la epurarea a numai 10% din activitatea inițială.

$T_{1/2}$ al componentei rapide este evaluat la 2 min pentru ^{43}K, 2,2 min pentru ^{81}Rb, 2,9 min pentru ^{201}Tl și 9 min pentru ^{129}Cs [2].

Acumularea și echilibrarea miocardică este dependentă de irigația organului; la un flux sanguin dat, datorită extracției miocardice diferite, radioionii examinați au viteze de acumulare cardiacă diferite.

^{43}K are o eficiență de extracție de aproximativ 70%, astfel încît activitatea miocardică maximă la om se atinge în 5—10 minute de la injectarea i.v.

Clearance-ul de părăsire miocardică al ^{43}K după injectarea intracoronariană este de aproximativ 60 minute. ^{81}Rb prezintă rate de acumulare și echilibrare miocardică foarte apropiate de cele ale ^{43}K.

^{201}Tl realizează acumularea miocardică maximă între 10—25 minute. $T_{1/2}$ biologic în miocard este exprimat de 2 exponențiale cifrate la 4,4 ore—70% din activitate — și 40 ore — 22% din activitate [3].

^{129}Cs prezintă o acumulare miocardică mai lentă explicată prin eficiența de extracție de numai 22%; activitatea maximă se atinge între 30—120 minute de la injectare, iar $T_{1/2}$ biologic al părăsirii miocardului este de 20—24 ore. Dintre toți ionii examinați este cel mai puțin corelat cu fluxul miocardic [4].

Alături de biocinetica miocardică, esențială pentru investigarea clinică este cunoașterea dinamicii biologice a acestor radioioni la nivelul ficatului, pulmonului și fundusului gastric, organe a căror vecinătate radioactivă poate influența calitatea informațiilor obținute privind irigația

Scanned with OKEN Scanner

mușchiului cardiac. Nishiyama și colab. [2] integrînd într-un index complex raportul activității miocardice față de cea a organelor înconjurătoare, indică drept interval optim pentru efectuarea vizualizării 10—20 minute de la injectare pentru ^{43}K, 15 minute pentru ^{201}Tl și 30 minute pentru ^{129}Cs, timpi la care raportul citat are valorile de respectiv 0,34, 0,38 și 0,34.

B. Mecanismul acumulării în miocardul normal și ischemic. Radioionii din acest grup se comportă ca bioanalogi de potasiu a cărui funcție în metabolismul miocardic este cunoscută [5]. Se știe că menținerea concentrației intracelulare a potasiului este un proces activ, consumator de bioenergie; diferențele în vitezele de acumulare miocardică a $^{43}K^+$ și $^{129}Cs^+$ sînt probabil corelate cu dimensiunile ionilor respectivi.

^{201}Tl pare a căpăta calitatea de bioanalog al K^+ tocmai datorită faptului că raza $^{201}Tl^+$ hidratat este de dimensiuni intermediare între cea a K^+ și Rb^+.

În investigarea irigației miocardice cu acești radioioni se pleacă de la principiul că acumularea și distribuția indicatorului în miocard este proporțională cu aceea a irigației miocardice. Consecința directă este vizualizarea ca zone hipofixante (imagine negativă) a regiunilor ischemiate sau infarctizate.

Demonstrarea unei zone hipofixante corespunzînd cicatricei transmurale de infarct miocardic rezultă probabil atît din reducerea masei celulare miocardice cît și din scăderea irigației în respectiva zonă. În cazurile de insuficiență coronariană realizarea unui contrast de vizualizare între zonele normale și cele ischemice se poate efectua prin teste de efort, caz în care viteza de acumulare a indicatorului în țesutul sănătos crește semnificativ, detașîndu-se de cea a țesutului ischemic în care hiperemia este minimă sau absentă. În acest caz, în afara factorului irigație, poate interveni și funcția adenozintrifosfatazei ce întreține gradientele electrochimice de membrană ale sodiului și potasiului; în ischemia miocardică se produce un eflux al potasiului miocardic care combinat cu acumularea mai redusă a ^{43}K are ca rezultat net zona de hipofixare [6].

Validarea acumulării cardiace a radiopotasiului ca test de irigație miocardică s-a făcut prin studii experimentale în care perfuzia miocardică a fost determinată simultan prin $^{43}K^+$, microsfere marcate și măsurători fizice de debit [7], atestîndu-se corelația existentă între valorile debitelor determinate prin cele trei metode în miocardul normal, ischemic și infarctizat. Distribuția $^{43}K^+$ măsoară perfuzia regională miocardică totală, indiferent de calea pe care sîngele circulă (perfuzie directă sau prin circulație colaterală). Alte cercetări experimentale au validat corelația dintre perfuzia determinată prin microsfere marcate și cea investigată prin radiocesiu și radiorubidiu [8, 9]. În ceea ce privește radiotaliul s-a găsit un coeficient de corelație de 0,97 între distribuția $^{201}Tl^+$ și cea a microsferelor atît în condiții de ocluzie coronariană parțială cît și de hiperemie reactivă miocardică; la cîini cu ocluzie coronariană ^{201}Tl a permis definirea mai exactă a leziunilor decît ^{43}K [10].

C. Iradiere, toxicitate, efecte secundare. În tabela 5.1 reprodusă după Feller și Sodd [11] sînt prezentate rezultatele calculelor dozimetrice privind acești radionuclizi; pentru ^{81}Rb s-a inclus în calcul și iradierea produsă de ^{81m}Kr.

Ținînd seama de activitățile uzual injectate în scop diagnostic, iradierea produsă de ^{43}K este relativ mai crescută decît cea a bioanalogilor săi. ^{201}Tl care are o utilizare clinică mai largă produce iradieri acceptabile;

organul critic este rinichiul iar medulara renală în care se concentrează taliul primeşte o doză de 1,1 rad/mCi [3].

Toxicitatea taliului la animale superioare şi om se manifestă prin depilare, tulburări gastro-intestinale, sindroame neurologice centrale; moartea survine la doze de aproximativ 2,8 mg/kg corp; cantitatea de taliu administrată ca radiofarmaceutic este de 10 000 ori mai mică decît cantităţile de taliu citate a produce efecte toxice minime [3].

TABELA 5.1

Aprecierea dozelor absorbite prin utilizarea unor radioioni de vizualizare miocardică (rad/mCi i.v.), modificat după Feller şi Sodd [11]

Radionuclidul	Întreg corp	Cord	Rinichi	Ficat	Pulmon	Testicule	Activ. diagn. uzuale mCi
^{81}Rb	0,08	0,16	0,22	0,14	0,10	0,09	2—4
^{129}Cs	0,17	0,25	0,23	0,22	0,16	0,21	2
^{201}Tl	0,24	0,17	0,39	0,15	0,12	0,30	1—2
^{43}K	0,6	0,52	0,52	0,53	0,43	0,58	1—2

Deşi utilizate în practica clinică la pacienţi cu afecţiuni cardiovasculare severe nu s-au semnalat pînă în prezent efecte secundare după administrarea diagnostică a acestei clase de PRF.

D. Valoarea comparativă a ^{43}K, ^{129}Cs, ^{81}Rb şi ^{201}Tl în investigarea irigării miocardice. Dintre cele 4 PRF considerate, preferinţele se îndreaptă în prezent către ^{201}Tl [12] în special pentru vizualizarea miocardului ischemic sau necrotic.

^{43}K, capul de serie fiziologic este dezavantajat de energia unor cuante γ de 619 keV, de redistribuţia rapidă după fixarea miocardică (în dezacord cu timpul necesar pentru realizarea vizualizării miocardului din incidenţe multiple) ca şi de costul său prohibitiv.

^{81}Rb — deşi procurabil comercial şi posibil a fi obţinut în ciclotroane mici, este dezavantajat de energia γ a ^{82m}Rb (0,5—1,47 MeV) care impurifică 30—40% din radiofarmaceutic în momentul utilizării; calitatea încă insuficient valorificată a ^{81}Rb este dezintegrarea sa în ^{81m}Kr, radioizotop cu difuziune tisulară rapidă, utilizabil pentru determinarea simultană a debitului sanguin/100 g ţesut/minut [13].

^{129}Cs are farmacocinetică puţin adecvată, fixarea sa miocardică fiind mai puţin dependentă de flux decît a celorlalţi radioioni; procurarea sa este dificilă (nelivrat comercial, randament de producţie scăzut la ciclotroanele de uz exclusiv medical).

$^{201}Tl^{+}$ are energia cuantelor gamma adecvată pentru aparatura de vizualizare existentă, iar caracteristicile farmacocinetice sînt convenabile; staţionează suficient timp în miocard pentru a permite obţinerea de imagini din incidenţe multiple. Calitatea imaginilor este superioară celor obţinute cu ceilalţi radionuclizi [2]. Este livrat comercial, dar necesită ciclotroane puternice pentru producere; costul radiofarmaceuticului rămîne ridicat. Numărul studiilor dinamice şi de vizualizare miocardică efectuate cu $^{201}Tl^{+}$ este în continuă creştere, iar în prezent pare a monopoliza investigaţiile de vizualizare efectuate cu PRF din grupul bioanalogilor potasiului [10, 14, 15, 16, 17].

Scanned with OKEN Scanner

5.1.1.2. **Trasori metabolizabili, citodependenţi, cu extracţie miocardică importantă.** Grup de PRF neomogen din punct de vedere chimic, dar deosebit de interesant pe plan teoretic farmacocinetic întrucît încearcă să selecteze produşi cu tropism metabolic selectiv miocardic. Această clasă de compuşi nu şi-a găsit încă exponentul optim pentru practica clinică.

A. Acizii graşi marcaţi. Acizii graşi liberi din plasmă sînt caracterizaţi printr-un clearance rapid, cu extracţie miocardică mare; fixarea în regiunile ischemice, în acord cu metabolismul ţesutului, este mai redusă creînd astfel premise de vizualizare cu un eventual produs marcat.

Întrucît acidul oleic este componenta majoră a acizilor graşi liberi din plasmă, investigaţiile au debutat prin vizualizarea miocardică cu ^{131}I—acid oleic, ulterior înregistrîndu-se încercări de folosire a produsului marcat cu ^{11}C, ^{18}F, ^{123}I şi ^{99m}Tc.

Extracţia miocardică a unor acizi graşi marcaţi injectaţi în scop clinico-diagnostic pare a fi mai lentă decît a celor marcaţi cu molecule intrinseci structurii proprii (^{14}C de exemplu); se pare că marcarea cu radionuclizi adecvaţi vizualizării modifică activitatea biologică a moleculei acidului gras.

Încercările de a reactualiza introducerea acizilor graşi marcaţi cu ^{99m}Tc, ^{125}I sau ^{123}I în vizualizarea miocardică au rămas încă în stadiu experimental [18, 19].

B. ^{13}N-amoniu ($^{13}NH_4^+$). $^{13}NH_4^+$ are caracteristici farmacocinetice interesante dar pune probleme deosebite de producţie şi vizualizare, ceea ce îi limitează utilizarea medicală la un număr foarte redus de laboratoare cu dotare tehnică de excepţie [20, 21].

$^{13}NH_4^+$ este extras din circulaţia coronariană în proporţie de 80—90% încă de la prima trecere prin miocard; se pare că topografia distribuţiei miocardice se corelează cu cea a perfuziei terminale. ^{13}N-amoniul acumulat în plămîni prin trecerea din plasmă în alveole este epurat respirator, astfel încît la 5 minute de la injectare se obţin rapoarte avantajoase între radioactivitatea miocardică şi cea pulmonară.

Mecanismul acumulării miocardice este fie schimbul ionic, fie încorporarea în fondul metabolic comun acid glutamic-glutamină din miocard. Pentru această ultimă eventualitate pledează faptul că acumularea miocardică a amoniului este diminuată de inhibitorii enzimelor ce participă la sinteza glutaminei [12].

Deşi în prezent grupul trasorilor metabolizabili, citodependenţi, cu extracţie miocardică importantă nu ocupă un loc semnificativ în aplicaţiile clinice, se apreciază că domeniul prezintă interes teoretic şi practic de perspectivă pentru obţinerea unor PRF miocardotrope. Ca orientări de cercetare citäm ^{11}C-cianura, ^{11}C-noeprinefrina, ^{18}F-etanolul şi ^{11}C-acid palmitic [1, 22, 23].

5.1.2. RADIOFARMACEUTICE CU TROPISM POZITIV PENTRU MIOCARDUL ISCHEMIC

Încercările de vizualizare pozitivă a zonelor miocardice ischemice sau necrotice efectuate iniţial cu compuşii organici ai ^{203}Hg sau cu ^{131}I-tetracicline, deşi validate pe plan experimental, au rămas infructuoase pe plan clinic [24].

Scanned with OKEN Scanner

Recent, ^{99m}Tc-tetraciclina şi mai ales ^{99m}Tc-pirofosfatul (^{99m}Tc-PP_1) au permis progrese semnificative cu reale implicaţii în diagnosticul sindroamelor de ischemie miocardică.

A. **^{99m}Tc-tetraciclina.** Dintre produsele marcate şi testate biologic (tetraciclina, oxi-, clor-, dimetilclortetraciclina) ^{99m}Tc-tetraciclina s-a dovedit a avea valoare şi în practica clinică.

Din punct de vedere farmaceutic, la animalele normale, antibioticul marcat are nefrotropism evident; la 1 oră de la injectare 40% din activitate este eliminată urinar, iar 30% se regăseşte în rinichi. Acumularea hepatică şi mai ales cea biliară nu este neglijabilă. Fixarea în miocardul normal este redusă [25, 26].

Localizarea ^{99m}Tc tetraciclinei se face în miocardul ireversibil lezat, iar delimitarea ei de miocardul normal este netă.

Cercetări experimentale au arătat că numai în primele 48 de ore se înregistrează contrastul radioactiv optim între ţesutul infarctizat şi cel normal. După 3—5 zile de la ocluzie valorile raportului scad, ca la o săptămînă să coboare sub valoarea 2 [29]. Aceste rezultate sugerează utilitatea ^{99m}Tc-tetraciclinei în vizualizarea miocardului necrotic numai în primele 2—3 zile post-infarct.

Într-un studiu clinic preliminar intervalul optim de vizualizare a fost 1—3 zile de la debutul clinic, normalizarea imaginii producîndu-se în 1—2 săptămîni de evoluţie [30].

Mecanismul acumulării ^{99m}Tc-tetraciclinei este investigat sub multiple faţete; ipotezele de lucru confirmate de date experimentale susţin formarea unor complecşi polinucleari cu macromoleculele denaturate (proteine, RNA şi DNA) din celulele necrozate [24, 27].

B. **^{99m}Tc-fosfaţii şi ^{99m}Tc-glucoheptonatul.** La doi ani de la introducerea ^{99m}Tc-pirofosfatului (^{99m}Tc-PP_1) în investigarea osoasă se descrie tropismul pozitiv al radiofarmaceuticului pentru ţesutul miocardic necrozat [3]. La animale cu infarct indus acumularea lezională a ^{99m}Tc-PP_1 realizează rapoarte ale radioactivităţii $\frac{\text{ţesut infarctizat}}{\text{ţesut miocardic normal}}$ cu valori variind între 10—25, funcţie de modelul experimental testat [28, 32, 33].

Pentru ^{99m}Tc-difosfonat (^{99m}Tc-HEDP) s-a demonstrat că acumularea trasorului în zona miocardică supusă experimentării devine semnificativă la scăderi ale irigaţiei sanguine de numai 11 $\pm$ 2%, ceea ce ar extinde posibilităţile PRF de la obiectivizarea zonelor necrotice la cea a zonelor ischemice [34].

Dinamica acumulării PP_1 în evoluţia infarctului experimental marchează un maxim timp de 1—6 zile de la producerea acestuia pentru a diminua apoi lent, posibilitatea localizării radioizotopice dispărînd la circa 2 săptămîni de la momentul acut [32].

Confruntările scintigrafice cu examenul histologic la cîini cu infarct produs experimental [35] au evidenţiat o corelaţie liniară între greutatea ţesutului infarctizat şi suprafaţa scintigrafică a infarctului. Alte cercetări confirmă aceste date aducînd în plus şi argumentul proporţionalităţii dintre concentrarea ^{99m}Tc-PP_1 şi depleţia tisulară de creatinin-fosfokinază [36].

În clinica umană folosirea ^{99m}Tc-PP_1 a făcut posibilă vizualizarea pozitivă a ariilor de infarct miocardic acut în primele zile de la producere [31].

Scanned with OKEN Scanner

Imaginile obținute în infarctul recent au intensitate de fixare supracostală; în evoluția infarctului acumularea PRF diminuă, astfel încît după 7 zile de la debut imaginea devine net subcostală, iar după 14 zile neidentificabilă. Publicațiile ulterioare confirmă vizualizarea pozitivă a infarctului cu ^{99m}Tc-PP$_1$, imaginile cele mai evidente obținîndu-se în infarctele transmurale [37, 38].

Topografia de vizualizare corespunde cu cea electro-cardiografică dar dimensiunile scintigrafice ale zonei infarctizate nu se corelează întotdeauna cu informațiile furnizate de creatinin-fosfokinază [36]. Se pare că ^{99m}Tc-pirofosfatul vizualizează atît miocardul ireversibil lezat cît și țesuturile cu risc necrotic din jur [28].

Imaginea miocardică pozitivă nu înseamnă însă în mod absolut necroză miocardică. Au fost descrise acumulări miocardice în angina pectorală [15, 39, 40]; în asemenea cazuri imaginile pozitive sînt mai puțin intense, cel mai adesea subcostale, slab definite, cu interpretare dificilă. S-au semnalat imagini fals pozitive în contuzii miocardice, traumatisme miocardice penetrante, anevrisme ventriculare stîngi, miocardiopatii [41, 42, 43].

Alături de ^{99m}Tc-PP$_1$ un alt agent de vizualizare pozitivă a miocardului infarctizat este ^{99m}Tc-glucoheptonatul care cunoaște însă o utilizare mai restrînsă.

Mecanismul localizării pozitive a ^{99m}Tc-PP$_1$ în zonele de ischemie miocardică își găsește două categorii de explicații. O primă teorie pleacă de la datele lui D'Agostino și Chiga [44], care demonstrează localizarea calciului ionic în mitocondriile celulelor miocardice necrozate, calciul părînd a fi încorporat într-o structură de tip cristalin, probabil hidroxiapatită.

Shen și colab. [45] consideră această acumulare de calciu, drept un indice al leziunilor celulare miocardice rezultate din ischemie. Acumularea ^{99m}Tc-PP$_1$ s-ar încadra astfel în mecanismul de localizare comun PRF osteotrope, respectiv legarea de hidroxiapatită.

O a doua teorie încearcă să dea o explicație unitară acumulării miocardice a ^{99m}Tc-chelaților fie ei dotați cu osteotropism sau lipsiți de această proprietate (cazul ^{99m}Tc-tetraciclinei și ^{99m}Tc-glucoheptonatului). Acumularea miocardică s-ar datora legării acestor ^{99m}Tc-chelați de proteinele solubile celulare, de macromoleculele denaturate ca urmare a ischemiei tisulare [26].

5.1.3. INDICAȚII DE UTILIZARE A RADIOFARMACEUTICELOR DESTINATE INVESTIGĂRII IRIGAȚIEI MIOCARDICE

Dezvoltarea acestei clase de radiofarmaceutice aduce o nouă dimensiune în problematica diagnosticului și urmăririi sindroamelor de ischemie miocardică, permițînd vizualizarea lor prin metode neinvazive. Indicațiile actuale de utilizare, deși în curs de precizare și continuă reconsiderare, pot fi schițate după cum urmează [2, 6, 12, 14, 15, 17, 24, 46, 47, 48, 49]:

a) detectarea prezenței infarctului miocardic acut; cu rezervele de selectivitate arătate mai sus ^{99n}Tc-PP$_1$ este trasorul de elecție. Absența vizualizării zonei de infarct ajută la infirmarea diagnosticului;

Scanned with OKEN Scanner

b) localizarea şi dimensionarea zonei de infarct miocardic acut: ^{99m}Tc-PP_1 supradimensionează suprafaţa infarctului, în timp ce ^{99m}Tc-tetraciclina şi mai ales ^{201}Tl delimitează zona propriu-zisă de ţesut infarctizat. Pentru localizări posterioare indicaţia de electie este ^{201}Tl.

c) stabilirea bilanţului lezional în cazul infarctelor repetate, cu ajutorul dublei vizualizări, respectiv ^{99m}Tc-PP_1 pentru leziunile acute şi ^{201}Tl pentru bilanţul lezional cumulativ. Deşi dubla vizualizare cu ^{201}Tl şi ^{99m}Tc-PP_1 oferă avantaje diagnostice indiscutabile, accesibilitatea radiofarmaceuticului marcat cu ^{99m}Tc face ca acesta să fie folosit cu predilecţie în practica clinică;

d) evaluarea pre- şi postoperatorie a pacienţilor supuşi intervenţiilor chirurgicale cardiace, în vederea detectării infarctelor intra- şi postoperatorii;

e) detecţia ischemiei de efort sau a afectării unei singure ramuri arteriale coronariene prin vizualizare miocardică cu ^{201}Tl în repaus şi în timpul testului de efort, procedeu ce pare a fi mai sensibil decît *EKG* de efort.

5.2. RADIOFARMACEUTICE DE OBIECTIVIZARE A PROCESELOR TROMBOTICE INTRAVASCULARE

Procesele trombotice intravasculare au o patogenie complexă, cu evoluţie dinamică, antrenînd intervenţia secvenţială a unei multitudini de factori parietali şi sanguini. Pentru marcarea *in vivo* a trombusului, în vederea obiectivizării diagnostice a existenţei sale, se testează factori ce intervin în diverse etape ale constituirii sau evoluţiei acestuia [50], după cum urmează: trombogeneză — fibrinogen marcat, trombocite marcate; adeziunea — macroagregate sau microsfere marcate; organizarea trombusului — leucocite marcate; reacţii imunologice — anticorpi marcaţi antifibrină şi antifibrinogen; fibrinoliza — plasminogen, diverse kinaze marcate (uro-, strepto-, fibrino-kinaze). Multitudinea verigilor patogenice abordate este justificată de intenţia creării unei baterii de PRF care să ofere posibilitatea intervenţiei diagnostice eficiente, indiferent de momentul dinamic al evoluţiei trombusului.

În prezent îşi găsesc aplicaţii PRF de obiectivizare a trombilor în curs de formare şi cele destinate detecţiei trombilor preformaţi.

5.2.1. RADIOFARMACEUTICE DE OBIECTIVIZARE A TROMBILOR ÎN CURS DE FORMARE

Marcarea fibrinogenului în scopul realizării unui PRF de diagnostic al trombozei *in vivo* ridică probleme fizice şi biologice [51].

Problemele fizice sînt legate de alegerea radionuclidului: au fost utilizaţi pînă în prezent ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{99m}Tc, ^{77}Br, fiecare cu avantaje şi dezavantaje; opţiunile prezente se opresc la ^{125}I în cazul beneficiarilor de produse comerciale şi ^{123}I pentru laboratoarele cu disponibilităţi de realizare a marcării fibrinogenului autolog.

Problema biologică primordială este conservarea nealterată a capacităţii de coagulare de-a lungul procesului de marcaj; produsul final tre-

Scanned with OKEN Scanner

buie să păstreze o coagulabilitate mai bună de 90% [52]. În ceea ce privește comportarea catabolică a fibrinogenului marcat — deși aparent paradoxal — modificarea $T_{1/2}$ biologic cu accelerarea clearance-ului plasmatic ca urmare a marcării nu constituie un impediment ci un avantaj în diagnosticul trombozelor, întrucît favorizează obținerea unui raport radioactivitate $\frac{\text{trombus}}{\text{sînge}}$ mai ridicat.

În condiții normale fibrinogenul plasmatic reprezintă 0,72 din cel al întregului organism; $T_{1/2}$ biologic în plasmă este de $4{,}1 \pm 0{,}5$ zile, iar fracțiunea catabolizată reprezintă $0{,}24 \pm 0{,}04$ zi^{-1} din fondul metabolic comun al fibrinogenului plasmatic [53].

Pentru fibrinogenul radioactiv viteza catabolică depinde de metoda de marcare utilizată, $T_{1/2}$ al dispariției plasmatice crescînd în ordine pentru marcarea prin ICl, enzime, electroliză și cloramină T [51]. Metoda de marcare influențează și raportul radioactivității $\frac{\text{trombus}}{\text{sînge}}$ obținut în condiții experimentale, raport care se cifrează la 9, 6, 2,5 și 1,5 respectiv pentru marcarea prin ICl, peroxidază lactică, cloramină T și electroliză [54].

Rata catabolică a fibrinogenului crește la o iodurare mai mare de 0,5 atomi iod/molecula de fibrinogen. Pentru produșii de fibrinogen cu iodurare ridicată (25 atomi iod/moleculă fibrinogen) se înregistrează o modificare a vitezei catabolice care este evident accelerată, ca și o creștere a raportului radioactivității $\frac{\text{trombus}}{\text{sînge}}$ ce atinge valori de 50 [55].

Produsele cu iodurare ridicată, deși cu rate catabolice nefiziologic crescute, sînt mai avantajoase pe plan diagnostic prin condițiile de detecție îmbunătățite.

Farmacocinetica radiofibrinogenului diferă la subiecții normali față de cei cu procese trombotice, prin faptul că rata catabolică este mai rapidă la aceștia din urmă [56].

Întrucît fibrinogenul intervine în primele stadii ale constituirii trombusului, raportul maxim radioactivitate $\frac{\text{trombus}}{\text{sînge}}$ se obține cînd fibrinogenul este administrat la 4 ore de la inducerea trombozei venoase; acumularea radiotrasorului este însă prezentă chiar la 72 ore de la debut [57, 58]. Fibrinogenul marcat apare deci ca un agent diagnostic util pentru obiectivizarea fazelor inițiale ale procesului trombotic.

Investigații clinice largi, efectuate în majoritate cu ^{125}I-fibrinogen, confirmă utilitatea restului de hiperfixare locală în detectarea precoce a proceselor trombotice; eficiența diagnostică maximă se obține administrînd sistematic PRF la bolnavii cu risc trombotic și monitorizînd dinamica radioactivității traiectelor venoase [50, 52, 59, 60, 61].

Energia redusă a cuantelor gamma emise de ^{125}I face ca acest PRF să nu poată fi utilizat petru detecția proceselor trombotice ale venelor iliace, venelor bazinului sau abdomenului, situate prea profund [60].

Exactitatea metodei în detecția trombozelor venoase ale membrelor inferioare este confirmată prin flebografia de contrast, concordată în 85—90% din cazuri [59]. Rezultate fals pozitive se obțin în prezența inciziilor chirurgicale recente, a hematoamelor, inflamațiilor localizate sau difuze, în primele 48 de ore după flebografii, ca și în varice difuze netrombozate [62].

Iradierea organismului la dozele diagnostice de 100 μCi ^{125}I-fibrinogen este apreciată la 0,17 rad pentru întreg corpul, 0,82 rad pentru sînge şi 0,32 rad pentru vezica urinară [63]. Pericolul potenţial de transmitere a hepatitei virale prin fibrinogen omolog nu poate fi teoretic exclus; în practică folosind loturi de donatori selecţionaţi riguros şi controlînd prezenţa Ag HB prin metode radioimunometrice [64] riscul real este neglijabil [52].

5.2.2. RADIOFARMACEUTICE DESTINATE DETECŢIEI TROMBILOR PREFORMAŢI

Întrucît fibrinogenul marcat permite numai detecţia proceselor trombotice în curs de constituire, pentru obiectivizarea trombuşilor preformaţi s-au testat enzime sau activatori trombolitici marcaţi. Se ştie că plasminogenul este asociat cu fibrina în interiorul coagulului sanguin şi că transformarea ei are loc probabil în situ, trecînd în plasmină după intervenţia unor activatori cum ar fi fibrinokinaza, streptokinaza sau urokinaza. Astfel kinaza marcată ar putea servi la detecţia trombusului sau trombo-embolusului aflat în stadiu de fibrinoliză.

Cercetări experimentale au confirmat posibilitatea unei asemenea abordări folosind streptokinaza şi urokinaza radioiodată [50] sau plasminogen marcat [65]. Produsele se fixează pe trombi chiar după 48 ore de la formare, realizînd raportul radioactivitate $\frac{\text{trombus}}{\text{sînge}}$ care permit vizualizarea scintigrafică a acestuia. Se remarcă o lipsă de reproductibilitate a rezultatelor ţinînd probabil de diferenţele existente între diferitele loturi de kinaze folosite pentru marcare.

Aplicaţiile în clinica umană sînt încă limitate, detecţia trombilor preformaţi cu mijloacele medicinii nucleare efectuîndu-se prin flebografia izotopică [50, 66, 67, 68].

5.2.3. INDICAŢII DE UTILIZARE A RADIOFARMACEUTICELOR DESTINATE DETECŢIEI PROCESELOR TROMBOTICE

Dintre radiofarmaceuticele discutate numai ^{125}I-fibrinogenul este aplicat curent în practica medicală, utilizarea sa fiind limitată la trombozele venoase ale membrelor inferioare, după cum urmează:

— detectarea precoce a procesului trombotic în curs de constituire la pacienţii cu risc ridicat (intervenţii chirurgicale cu risc, imobilizări prelungite etc.) şi instituirea tratamentului adecvat cu reducerea incidenţei accidentelor tromboembolice;

— localizarea procesului trombotic în faza infraclinică, cu urmărirea extensiei lui; energia slabă a ^{125}I face accesibil numai teritoriul venos situat distal de jumătatea coapsei;

— obiectivizarea rezultatelor terapiei atît în cazuri individuale cît mai ales pe loturile largi în care se aplică metode profilactice sau curative.

Scanned with OKEN Scanner

În afara domeniului trombozelor venoase fibrinogenul-^{125}I își găsește utilizarea în :

— detecția ejecției acute în transplantul renal,
— investigarea ratei de catabolizare a fibrinogenului,
— investigarea acumulării fibrinogenului în tumori.

5.3. RADIOFARMACEUTICE DESTINATE EXPLORĂRII HEMODINAMICII SISTEMICE ȘI LOCO-REGIONALE

Principalele PRF utilizate în acest scop sînt :

a) PRF pentru explorarea perfuziei tisulare cu subgrupele :

— trasori inerți metabolic cu difuziune tisulară rapidă : radioxenon, radiokripton, radioiod-antipirină ;

— trasori cu extracție tisulară completă, fără dependență de metabolismul celular : macroagregate și microsfere radioactive ;

b) PRF pentru explorarea hemodinamicii la nivelul cavităților cardiace și a vaselor mari cu subgrupele :

— trasori cu remanența intravasculară,
— trasori cu difuziune extravasculară.

5.3.1. RADIOFARMACEUTICE PENTRU EXPLORAREA PERFUZIEI TISULARE

5.3.1.1. Trasori inerți metabolic cu difuziune tisulară rapidă. Subgrupa include în special gazele radioactive, utilizate pe plan clinic în diverse determinări de debit [69].

Într-adevăr, aplicarea principiului lui Fick permite calculul debitului sanguin local sau loco-regional prin determinarea externă a curbei variației concentrației gazului inert radioactiv în funcție de timp la nivelul țesutului considerat [70]. Din punct de vedere radiofarmaceutic validarea metodei este condiționată de inerția metabolică a gazului radioactiv, de difuzia rapidă în țesuturi a acestuia cu realizarea echilibrării sînge/țesut, de absența recirculației radiotrasorului, precum și de emisia radionuclidică adecvată detecției externe *in vivo*.

Caracterul inert metabolic este conferit prin definiție respectivelor gaze, ele nefiind concentrate activ la nivelul organelor și nemodificîndu-și identitatea chimică la trecerea prin țesuturi.

Difuzia rapidă realizează un echilibru fizic adecvat între țesutul investigat și sîngele ce-l irigă [71]. Dacă echilibrul de difuzie între țesut și sînge este atins într-un timp mai scurt decît cel în care sîngele traversează lungimea respectivelor capilare, atunci debitul sanguin tisular (ml/100 g țesut/minut) va fi egal cu constanta de viteză a epurării gazului radioactiv multiplicată prin coeficientul de repartiție sînge/țesut. Coeficientul de repartiție (λ) reprezintă valoarea de echilibru a raportului $\frac{\text{solubilitate în țesut}}{\text{solubilitate în sîngele total}}$ termenii raportului fiind exprimați în ml/g. Gazele inerte posedă o solubilitate înaltă în lipide și întrucît conținutul în lipide al diferitelor țesuturi este diferit, λ va căpăta valori diferite. Cohn [71] care a studiat echilibrul de distribuție al ^{133}Xe în diferite țesuturi determină

următoarele valori ale solubilității relative : apă 1,00, plasmă 1,45, eritrocite 3,75, mușchi scheletic 1,62 ; ținînd seama de definiția coeficientului λ, devine evident faptul că variațiile sale interindividuale pot fi determinate atît de diferențele în conținutul tisular de lipide cît și de variațiile hematocritului [72, 73]. Pentru calculul debitelor sanguine se folosesc valori medii ale coeficientului λ, ceea ce poate introduce erori apreciabile, mai ales pentru organele în care stările patologice se însoțesc de modificări în conținutul tisular al lipidelor (ficat, miocard).

Absența recirculației trasorului, condiție de validare a relației dintre clearance-ul tisular al gazelor inerte și debitul sanguin, este satisfăcută aproape integral, întrucît difuzibilitatea lor asigură eliminarea ventilatorie a trasorului în proporție de 95—90% încă de la primul pasaj pulmonar al sîngelui ce părăsește țesutul investigat [73].

Emisia radionuclidică adecvată detecției externe *in vivo* este asigurată de ^{85}Kr, ^{135}Xe și ^{133}Xe ; în prezent cel mai utilizat ca radiofarmaceutic este ^{133}Xe, condiționat în soluție salină sau diverse sisteme de porționare ca gaz.

Pentru determinarea debitului sanguin la nivelul unui organ dat sînt posibile variate metode de realizare a „impregnării" cu gazul inert radioactiv : injectare intratisulară cît mai atraumatică, administrare în aferența arterială a organului, administrare inhalatorie ș.a. Constanta de viteză a epurării trasorului este direct proporțională cu irigația organului și cunoașterea ei permite calculul estimativ al debitului sanguin/100 g țesut/minut. Întrucît echilibrul sînge-țesut se produce la nivelul circulației capilare, debitul obținut reprezintă irigația terminală a țesutului și nu include circulația colaterală din organul investigat. În cazul în care organul investigat are în componența sa regiuni cu regimuri circulatorii diferite, clearance-ul gazului inert va fi multiexponențial, permițînd uneori estimarea separată a respectivelor debite sanguine [74].

TABELA 5.2

Utilizări ale ^{133}xenonului în determinarea debitului sanguin

Organul	Valoarea medie a coef. λ	Calea de administrare *	Bibliografie
Mușchi	0,7	i.t. ; i.a.	[70, 75]
Miocard	0,72	i.a. ; i.t.	[76]
Ficat	0,72	i.a. ; i.t., injectare vena portă	[77, 78]
Creier			
subst. cenușie	0,8	i.a. ; a.i.	[74, 79, 80]
subst. albă	1,5		
Piele	0,7	i.a. ; difuziune	[81]
Țesut adipos	8—10	i.a. ; a.i.	[82]
Sinovială	1	injectare intra-articulară	[83]
Rinichi	0,7	i.a.	[84, 85, 86]

* i.t. = injectare intratisulară ; i.a. = injectare aferență arterială ; a.i. = administrare inhalatorie.

Descrierea tehnicilor diagnostice utilizînd gaze inerte radioactive depășește cadrul lucrării de față : tabela 5.2., ilustrează însă unele aplicații clinice ale ^{133}Xe pentru determinări ale debitului sanguin terminal la nivelul diferitelor organe și țesuturi.

Scanned with OKEN Scanner

Iradiere — condiționare — manipulare. Iradierea subiectului este redusă avînd în vedere eliminarea rapidă a trasorului din organism. Organul critic este trahea, datorită eliminării expiratorii și ventilării spațiului mort. În cazul ^{133}Xe la o activitate de 50 μCi injectată în mușchi iradierea traheală este de 1 mrem, iar cea gonadică de 0,02 mrem; pentru 200 mCi de ^{85}Kr dozele respective sînt de 2 și 0,02 mrem [70].

Condiționarea radioxenonului pentru utilizare clinică este făcută fie în flacoane multidoză cu soluție salină fiziologică în care gazul este solvit, fie în seringi, destinate unei singure utilizări. Manipularea PRF se face în circuit închis, fără contact cu aerul care ar duce la pierderea gazului din soluție.

5.3.1.2. **Trasorii cu extracție tisulară completă, fără dependență de metabolismul celular.** Reprezintă o subgrupă ce cuprinde în principal macroagregatele și microsferele de serumalbumină umană marcate cu diferiți radionuclizi gamma emițători (^{131}I, ^{99m}Tc, ^{113m}In).

Principiul utilizării lor diagnostice constă în realizarea unor microembolizări ale circulației terminale prin injectarea radiofarmaceuticului în aferența vasculară a organului, proces ce reproduce distribuția fluxului sanguin local (PRF—PP; produse radiofarmaceutice particulate de perfuzie). Aplicate pe scară largă în explorarea perfuziei pulmonare, PRF—PP pot fi utilizate, în principiu, pentru investigarea distribuției fluxului sanguin la nivelul oricărui teritoriu vascular. Folosirea lor în evaluarea perfuziei coronariene ilustrează atît modul elegant în care aceste produse rezolvă unele probleme inaccesibile altor tehnici, cît și dificultățile ridicate de abordarea acestui domeniu circulator.

Experiența clinică convingătoare dobîndită de Jansen și colab. [88] pe un grup de 1100 cazuri a folosit atît macroagregate cît și microsfere; prin injectarea separată a suspensiei particulelor marcate cu ^{99m}Tc în artera coronară stîngă și cu ^{131}I în cea dreaptă devine posibilă vizualizarea diferențiată a contribuției respectivelor vase la perfuzia globală miocardică.

În afara datelor ce se suprapun celor furnizate și de angiografia coronariană, această tehnică de capilaroembolizare informează în plus asupra condiției patului capilar miocardic la nivele substenotice, despre valoarea funcțională a circulației colaterale și separă miocardul cicatricial de cel ischemic, dar încă viabil.

Injectarea directă a particulelor radioactive de serumalbumină în arterele coronare este lipsită de riscuri majore atunci cînd se efectuează în condiții riguroase de control radiofarmaceutic și confort tehnico-medical [89, 90].

În afara acestei utilizări de excepție, mai sînt edificatoare pentru valoarea teoretică și practică a PRF—PP aplicațiile în domeniul investigării circulației membrelor ca și a hemodinamicii cerebrale, renale, portale sau cutanate [87].

5.3.2. RADIOFARMACEUTICE PENTRU EXPLORAREA HEMODINAMICII LA NIVELUL CAVITĂȚILOR CARDIACE ȘI AL VASELOR MARI

Investigarea hemodinamicii la nivelul cavităților cardiace și a vaselor mari este apanajul explorărilor funcționale și radiologice în care pe primul plan se plasează indicatorii neradioactivi. Plecînd de la princip

clasice ale fiziologiei clinice o serie de teste radioizotopice competiţionează pentru acceptarea lor în cadrul datelor utile elaborării diagnosticului funcţional complet. Principalele avantaje pe care le poate aduce introducerea PRF în acest domeniu de explorare sînt oferite de caracterul neinvaziv al tehnicilor ca şi de posibilitatea unor cantificări mai exacte a rezultatelor.

PRF din acest grup, în special cele destinate studiilor dinamice, trebuie să îndeplinească următoarele condiţii: a) comportare identică cu cea a curentului sanguin în procesul hemodinamic urmărit; b) randament fotonic mare al radionuclidului şi energie compatibilă cu parametrii camerei de scintilaţie; c) activităţi specifice şi concentraţii radioactive ridicate permiţînd injectarea în volume reduse (0,5 — 1 ml) a unor activităţi de ordinul milicuriilor; d) timp de înjumătăţire fizic scurt, ţinînd seama că procesele urmărite se desfăşoară în intervale de ordinul secundelor; e) absenţa unor efecte proprii de modificare a hemodinamicii; f) iradiere redusă.

5.3.2.1. **Radiotrasorii cu remanenţă intravasculară.** Devin o necesitate diagnostică atunci cînd urmărim vizualizarea statică a unor spaţii vasculare (cavităţi cardiace, placentă) sau în cazurile în care calculul parametrilor hemodinamici impune cunoaşterea volumului sanguin circulant la momentul de echilibru al mixicei intravasculare.

Principalele PRF din acest subgrup sînt: ^{99m}Tc-serumalbumina umană (^{99m}Tc-SAU) şi ^{113m}In-transferina (^{113m}In-TFe].

De pe poziţiile fiziologiei clinice deosebim în biocinetica lor comportarea hemodinamică intravasculară cu distribuţia precoce în organism (fază desfăşurată în interval de secunde-minute) ce interesează pentru investigaţiile cardio-vasculare şi comportarea metabolică, mai precis catabolică (cu durată de ordinul zilelor).

^{99m}Tc-SAU introdusă în medicina nucleară de Stern şi colab. [90] încă din 1965, a rămas la o utilizare practică relativ redusă întrucît nu s-a ajuns la o metodă de preparare care să asigure un produs standardizat. Rezervele sînt justificate de cunoaşterea incompletă a radiochimiei ^{99m}Tc, de faptul că distribuţia biologică a ^{99m}Tc-SAU produsă prin diferite metode (5—6 la număr) este diferită, ca şi de lipsa reproductibilităţii de la zi la zi a preparatelor obţinute prin aceeaşi metodă [91, 92, 93].

Pe plan farmaceutic experimental, la şoarece, ^{99m}Tc-SAU cu calităţi biologice corespunzătoare rămîne în sînge în procent de 60—65% la 30 minute de la injectare; cînd radioactivitatea hepatică la acelaşi interval de timp depăşeşte 10—15%, atunci produsul conţine ^{99m}Tc-insolubil sau albumină marcată denaturată, ambele captate de celulele kuppferiene; cînd radioactivitatea tractului gastro-intestinal depăşeşte 1% excesul reprezintă ^{99m}Tc-pertechnetat [92].

În condiţiile unui preparat adecvat, procentul radioactivităţii rămase intravascular la om, după o oră de la administrare este de 46 $\pm$ 10,5%, ceea ce corespunde necesităţilor practice de vizualizare a cavităţilor cardiace sau spaţiilor vasculare placentare.

Exigenţele de biodistribuţie se impun în special în cazurile în care PRF este utilizat pentru determinări cantitative ce includ calculul volemiei; în aceste cazuri fixarea hepatică duce la valori eronat crescute ale volumului plasmatic total.

Pentru tehnicile de vizualizare a cavităţilor cardiace imaginile obţinute sînt nesatisfăcătoare dacă eficienţa iniţială de marcare a ^{99m}Tc-SAU este mai mică de 85% [93].

În vizualizarea placentară prezenţa $^{99m}TcO_4^-$ ionic, care traversează bariera foeto-placentară, duce la creşterea inutilă a iradierii foetale.

^{113m}*Indiul ionic* injectat intravenos, la un pH de 1,4 — 2,5 se leagă imediat şi cantitativ de transferina plasmatică devenind astfel radiofarmaceutic cu remanenţă vasculară [94].

Dispariţia din plasmă se face cu un $T_{1/2}$ de circa 3 ore, cu încorporarea medulară a produsului [95].

Excreţia urinară a radioactivităţii este neglijabilă; de asemenea, transferul placentar este practic absent pentru ^{113m}In-T.Fe [96].

Sînt de subliniat următoarele variaţii posibile în comportarea farmacocinetică a ^{113m}In ionic administrat intravenos:

— injectat la pH mai mare de 2,5 distribuţia în organism se modifică funcţie de pH-ul soluţiei, pentru ca la valori ale acestuia de 7,5, datorită insolubilităţii produsului, să se obţină PRF de vizualizare a SRE [95];

— în cazurile în care transferina plasmatică este insuficientă sau saturată (deficienţa de sinteză, hemocromatoză, administrare terapeutică de compuşi ai fierului), $^{113m}In\,Cl_3$ administrat nu mai dispune de receptor globulinic, rămîne sub formă ionică şi se elimină parţial prin urină [96].

Principalele utilizări diagnostice ale acestor PRF cu remanenţă vasculară sînt cele de vizualizare a spaţiilor sanguine (cavităţi cardiace, placentă ş.a.) şi radiocardiografia cantitativă.

În aceste investigaţii PRF marcate cu ^{99m}Tc şi ^{113m}I sau ^{111}In au înlocuit practic ^{131}I-serumalbumina umană datorită superiorităţii lor cumulative pe plan tehnologic şi radiobiologic (tabela 5.3).

TABELA 5.3

Iradierea comparativă produsă de unele radiofarmaceutice cu remanenţă intravasculară [96, 97]

Radiofarmaceutic	Explorarea cord-vase mari			Placentografie	
	Posologie uzuală, mCi	Iradiere (mrad)		Posologie uzuală, mCi	Iradiere foetală mrad
		întreg corp	sînge		
^{131}I-serumalbumină umană	0,5—1,5	1000—4000	7000—26000	0,005—0,01*	7—14
^{99m}Tc-serumalbumină umană	2—5	30—60	90—200	1—3	15—45
^{113m}In-transferină	3—5	70—100	200—300	3	30

* Numai radiometrie externă, fără vizualizare.

Indicaţiile utilizării radiotrasorilor cu remanenţă intravasculară sînt următoarele:

— diagnosticul pericarditelor exudative la volume de lichid mai mari de 150—200 ml [97];

— evaluarea funcţiei ventriculare stîngi (volum ventricular stîng, fracţiunea ejectată) şi modificările de cinetică regională a peretelui miocardic ventricular prin scintifotografia electivă pe fazele ciclului cardiac (sistolă, diastolă), vizualizarea discontinuă fiind comandată electrocardiografic [98];

Scanned with OKEN Scanner

— radiocardiografia cantitativă cu determinări de debite, volume şi timpi de circulaţie cardiacă şi în mica circulaţie [99, 100, 101];

— diagnosticul tumorilor intracardiace şi diagnosticul diferenţial al formaţiilor tumorale hepatice şi cerebrale [102];

— diagnosticul radiopletismografic constînd în determinarea dinamicii volumului sanguin la diferite nivele (creier, muşchi scheletic, articulaţii ş.a.) sub influenţa unor solicitări funcţionale [103, 104, 105];

— placentografia radioizotopică cu determinarea poziţiei placentei [96, 106].

5.3.2.2. **Trasorii cu difuziune extravasculară.** PRF ale acestui subgrup sînt utilizabile numai în explorările hemodinamice urmărind comportarea trasorului în timpul unei singure treceri prin sistemul circulator. După ce în trecut s-au utilizat o serie de radionuclizi cu viaţă fizică scurtă dar emiţînd radiaţii gamma cu energii mai mari de 400 keV (^{128}I, ^{132}I, ^{137m}Ba) majoritatea acestor investigaţii se efectuează în prezent cu ^{99m}Tc-pertechnetat [107]. Alegerea este dictată de compatibilitatea energetică a ^{99m}Tc cu caracteristicile camerei de scintilaţie ca şi de disponibilitatea PRF. Informaţiile funcţionale (curba de diluţie) şi morfologice (vizualizarea secvenţială) obţinute la camera de scintilaţie după injectarea unui bol radioactiv în curentul sanguin fundamentează metoda angiografiei radioizotopice.

Pe plan radiofarmaceutic condiţia esenţială pentru reuşita angiografiei izotopice — injectarea în masă compactă a trasorului („bol radioactiv"), obligă la utilizarea unor concentraţii radioactive de 10—20 mCi/ml soluţie ^{99m}Tc-pertechnetat. Asemenea concentraţii sînt obţinute din minigeneratori cromatografici conţinînd ^{99}Mo produs prin fisiune sau generatori de extracţie cu metiletilcetonă [108]. În cazul generatorilor cromatografici conţinînd ^{99}Mo produs prin iradiere obţinerea unor asemenea concentraţii radioactive este posibilă fie dispunînd de generatori cu activităţi iniţiale mari (400—500 mCi), fie efectuînd eluări fracţionate şi folosind soluţia cu activitate specifică maximă.

Bolul radioactiv injectat furnizează informaţii utile pe plan diagnostic numai la prima sa trecere prin aparatul cardio-vascular, deoarece odată cu recirculaţia sa, se produce şi difuziunea extravasculară a PRF.

Datele obţinute se referă la teritoriul vascular asupra căruia este poziţionat detectorul, în principal cord — mica circulaţie — aortă, dar tehnica este aplicată şi în explorarea hemodinamică renală sau cerebrală.

La 6 minute de la injectare — timpul maxim de omogenizare la trasorii cu remanenţă intravasculară — 46 % din $^{99m}TcO_4^-$ a difuzat în spaţiul extravascular şi 49 % este încă intravascular; la 1 oră de la injectare numai 27 % rămîne intravascular [109]. Clearance-ul renal al pertechnetatului reprezintă aproximativ 14 % din clearance-ul inulinic [110].

$^{99m}TcO_4^-$, în pofida atributelor ce-i asigură compatibilitatea cu camera de scintilaţie, are $T_{1/2}$ fizic (6,03 ore) prea lung şi biocinetică de eliminare lentă pentru obiectivizarea unor procese hemodinamice ce se desfăşoară pe o durată de numai 30—50 secunde. De aceea, par a fi mai indicaţi pentru aceste studii alţi compuşi cum ar fi ^{99m}Tc-DTPA, chelat cu clearance glomerular apropiat de al inulinei.

Angiografia radioizotopică furnizează informaţii anatomice de calitate inferioară celor obţinute cu ajutorul angiografiei selective cu produse de contrast iodate, dar este superioară acesteia prin caracterul atraumatic şi inocuitate. Iradierea în rad produsă de 10 mCi $^{99m}TcO_4^-$ administraţi

intravenos este următoarea: întreg corp 0,14, stomac 2,5, tiroidă 1,3, măduvă osoasă 0,19, ovare 0,22, testicule 0,09, peretele vezicii urinare 0,53 [109].

Indicaţiile radiofarmaceuticelor cu difuziune extravasculară se referă în principal la angiografia radioizotopică care se recomandă, în următoarele cazuri [111, 112, 113, 114, 115, 116, 117]:

— investigarea preliminară a bolnavilor adulţi ambulatori sau spitalizaţi suspectaţi de afecţiuni cardiace congenitale sau dobîndite, obstrucţie a venelor cave şi anevrism aortic;

— investigarea hemodinamică a copiilor cu cardiopatii congenitale;

— investigarea pacienţilor prezentînd hipersensibilitate la produse radiologice de contrast;

— investigarea pacienţilor a căror stare generală este prea gravă pentru a permite efectuarea cateterismului cardiac sau a angiografiei cu mijloace de contrast;

— investigarea repetată a aceluiaşi bolnav pentru urmărirea evoluţiei cardio-vasculare sau efectuarea unor bilanţuri terapeutice medicale şi chirurgicale.

BIBLIOGRAFIE

1. N. D. Poe, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975.
2. H. Nishiyama, V. J. Sodd şi colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 880 (1976).
3. P. R. Bradley-Moore, E. Lebowitz, M. W. Greene, *J. Nucl. Med.*, **16**, 156, (1975).
4. W. D. Love, Y. Ishihara, L. D. Lyon, *Am. Heart J.*, **76**, 353, (1968).
5. R. Barbu, „Fiziopatologie", Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1975.
6. B. L. Zaret, N. D. Martin, M. D. Flamm, în „Cardiovascular nuclear medicine", C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1974.
7. E. K. Prokop, W. Strauss, *Circulation*, **50**, 978 (1974).
8. L. Becker, R. Ferreira, M. Thomas, *J. Nucl. Med.*, **15**. 969 (1974).
9. N. D. Poe, *Radiology*, **106**, 341 (1973).
10. W. Strauss, K. Harrison şi colab., *Circulation*, **51**, 641 (1975).
11. P. A. Feller, V. J. Sodd, *J. Nucl. Med.*, **16**, 1070 (1975).
12. M. Cooper, în „Cardiovascular nuclear medicine"; p. 149, C.V. Mosby Comp.. Saint Louis, 1974.
13. T. Jones, C.M.E. Matthews, *Nature*, **230**, 119 (1971).
14. * * * „Highlights of Nuclear Medicine", Published by the Society of Nuclear Medicine, New York, 1977.
15. B.L. Zaret, *Circulation*, **53**, supl. 1, 126 (1976).
16. D. Turner, W. Battle, *J. Nucl. Med.*, **19**, 249 (1978).
17. W.L. Ashburn, M. Schelbert, în „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, AIEA, Vienna, 1977.
18. N.D.Poe, G.D. Robinson şi colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 1077, (1976).
19. J.F. Bonte, K. Grahan şi colab., *J Nucl. Med.*, **14**, 381 (1973).
20. P.V. Harper, J. Schwartz şi colab., *Radiology*, **108**, 613 (1973).
21. P.V. Harper, K.A. Lathrop şi colab., „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med., New York, 1975, p. 180.
22. A.N. Ansari, în „Cardiovascular nuclear medicine", C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1974, p. 234.
23. E. J. Hoffman, M.E. Phelps şi colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 57 (1977).
24. L. Holman, în „Cardiovascular nuclear medicine", C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1974, p. 226.
25. M.K. Dewanjee, C. Fliegel şi colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 176 (1974).
26. I. Holman, M.K. Dewanjee, J. Idoine, *J. Nucl. Med.*, **14**, 595 (1973).
27. M.K. Dewanjee, P.C. Kahn, *J. Nucl. Med.*, **17**, 639 (1976).
28. M.A. Davis, L.B. Holman, A.N. Carmel, *J. Nucl. Med.* **17**, 911 (1976).
29. B.L. Holman, F.G. Zweiman, *J. Nucl. Med.*, **16**, 1144 (1975).
30. B.L. Holman, M. Lesch şi colab., *Am. J. Cardiol*, **33**, 144 (1974).

Scanned with OKEN Scanner

87. H.N. Wagner Jr., B. Rhodes, Sasakiy, J. Ryan, *Invest. Radiol.*, **4**, 374 (1969).
88. C. Jansen, G.M. Gramea. M.P. Judkins, „Cardiovascular nuclear medicine", Mosby Company, Saint Louis, 1974, p. 211.
89. D.A. Weller, „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 370.
90. N.D. Poe, *J. Nucl. Med.*, **12**, 724 (1971).
91. * * *, SUMMARY REPORT, „Radiopharmaceuticals from Generator — Produced Radionuclides", p. 169. IAEA, Vienna, 1971.
92. B.A. Rhodes, *Sem. Nucl. Med.*, **4**, 281 (1974).
93. R.J. Callahan, K.A. Mc Kusick și colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 47 (1976).
94. M.S. Stern, D.A. Goodwin și colab., *Nucleonics*, **25**, 62 (1967).
95. N.N. Wagner Jr., N.S. Stern și colab., „Medical Radioisotope Scintigraphy", vol. 2, p. 3, IAEA, Vienna, 1969.
96. P.M. Johnson, D.L. King, *Sem. Nucl. Med.*, **4**, 75 (1974).
97. E.V. Staab, D.D. Patton, *Sem. Nucl. Med.*, **3**, 191 (1973).
98. B. Pitt, P. Rigo, H.M. Strauss, „Cardiovascular Nuclear Medicine" C.V. Mosby Company Saint Louis, 1974, p. 121.
99. B. Delaloye, A. Bischof-Delaloye, W. Nedinger, J.L. Rivier, „Dynamic Studies with Radioisotopes in Medicine", p. 705, IAEA, Vienna, 1971.
100. L. Donato, C. Giuntini și colab., *Circulation*, **26**, 174 (1962).
101. P. Vernejoul, *Ann. Biol. Clin.*, **26**, 275 (1968).
102. E. Lubin, Z. Levitus și colab., „Medical Radioisotope Scintigraphy", p. 431, IAEA, Vienna, 1973.
103. R.W. Steenburg, B.H. Thomasson, *J. Surg. Res.*, **5**, 41 (1965).
104. D. Ancri, Ann. Med. interne, **127**, 359(1976).
105. G. Georgescu, J. Zaharescu, N. Teleki, A II-a Conferință Națională de reumatologie, p. 82, București, 1973.
106. S. M. Larson, „Clinical Scintillation Imaging", ed. a II-a, Cap. 14, Grune and Stratton, New York, 1975, p. 623.
107. P. de Vernejoul, J. de Olmo, A. Rangel-Abundis, Kellershonn, „Radioakt. Isot. in Klin. und Forsch", Band VII, Urban-Schwarzenberg, München, 1967, p. 46.
108. R. E. Boyd, „Radiopharmaceuticals and labelled compounds", vol. 1, p. 3, IAEA, Vienna, 1973.
109. * * * MIRD, Dose estimate report Nr. 8, *J. Nucl. Med.*, **17**, 74 (1976).
110. D. A. Dayton, F. T. Maher, L. R. Elveback, *Mayo Clin. Proc.*, **44**, 549, (1969).
111. J. P. Kriss, L. P. Enright și colab., *Circulation*, **43**, 792 (1971).
112. F. T. Wesselhoe, P. J. Hurley și colab., *Circulation*, **45**, 77 (1972).
113. W. G. Hayden, J. P. Kriss, *Sem. Nucl. Med.*, **3**, 177 (1973).
114. H. P. Brevel, P. Heimburg și colab., *Fortschr. Roentgenstr.*, **119**, 159 (1973).
115. G. S. Freedman, „Cardiovascular Nuclear Medicine", Mosby Company, Saint Louis, 1974, p. 101.
116. D. L. Kirch, P. P. Steele și colab., „Dynamic studies with radioisotopes in medicine" vol. 2, p. 271, IAEA, Vienna, 1975.
117. A. O. Alderson, V. A. Gaudiani și colab., *J. Nucl. Med.*, **19**, 364 (1978).

Capitolul 6

RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN EXPLORAREA APARATULUI URINAR

Dezvoltarea PRF folosite în explorarea nefro-urologică înregistrează trei momente semnificative de evoluţie şi progres.

Eforturile iniţiale s-au cantonat pe marcarea intrinsecă cu ^{131}I a unor compuşi iodaţi folosiţi în mod clasic fie în explorarea funcţională renală, fie în investigarea radiologică cu produşi de contrast. Din această perioadă datează majoritatea compuşilor radioiodaţi folosiţi în estimarea filtrării glomerulare.

Prepararea ^{131}I-ortoiodohipuratului şi a ^{203}Hg-clormerodrinului semnifică debutul unei noi etape, caracterizată prin apariţia unor metodologii de investigare nefro-urologică proprii medicinei nucleare în care însă, pe plan conceptual, PRF rămîn încă tributare unor capitole ale farmacologiei clasice.

Numai după „redescoperirea medicală" a ^{99m}Tc cercetările din domeniul PRF utilizate în explorarea aparatului urinar păşesc pe un drum propriu, caracterizat prin introducerea unor compuşi originali cum ar fi ^{99m}Tc—Fe ascorbatul şi, mai recent, ^{99m}Tc-Sn-glucoheptonatul sau ^{99m}Tc-Sn-dimercaptosuccinatul.

În prezentarea PRF folosite pentru investigarea aparatului urinar se va utiliza drept criteriu de clasificare tropismul radiocompuşilor la nivelul nefronului, tratînd separat produsele cu tropism predominant glomerular de cele cu tropism predominant tubular.

6.1. RADIOFARMACEUTICE CU EXCREŢIE PREDOMINANT GLOMERULARĂ

Aceste PRF au fost iniţial utilizate numai pentru determinarea cantitativă a filtratului glomerular. Criteriile ce trebuie îndeplinite de produsele destinate determinărilor filtratului glomerular au fost riguros formulate în fiziologia clinică de H. Smith [1] păstrîndu-şi integral valabilitatea şi pentru explorările radioizotopice : a) eliminare din organism exclusiv prin filtrare glomerulară ; b) inerţie fiziologică şi metabolică ; c) absenţa legării de proteine ; d) absenţa efectelor toxice ; e) posibilitatea dozării exacte, precise şi reproductibile a produsului în plasmă şi în urină. În cazul PRF trebuie să mai adăugăm : stabilitatea radiochimică *in vivo* şi *in vitro*, marcarea cu un radionuclid gamma emiţător detectabil extern şi doză de iradiere redusă.

Produsul diagnostic de referinţă este inulina, aşa încît în practica clinică valorile normale ale filtrării glomerulare sînt echivalate cu cele ale clearance-ului inulinic (131 $\pm$ 21,5 ml/min la bărbat şi 117 $\pm$ 15,6 ml/min

la femeie); validarea oricărui nou compus, inclusiv a PRF, se face prin studiul comparativ cu acest „etalon funcțional" unanim acceptat.

Încercările, justificate teoretic, de a utiliza ^{14}C-inulina sau derivați radioiodați ai inulinei în diagnosticul funcțional renal nu au găsit o aplicare practică largă. Trei grupe de substanțe radioactive sînt în prezent creditate drept PRF pentru determinarea filtrării glomerulare: derivații radioiodați ai unor substanțe de contrast urografic (grupa diatrizoat și iotalamat), vitamina B_{12} marcată și grupa chelaților radioactivi.

6.1.1. DERIVAȚII RADIOIODAȚI AI UNOR SUBSTANȚE DE CONTRAST UROGRAFIC

PRF ale acestui grup, marcate cu ^{131}I sau ^{125}I includ derivații diatrizoatului (sarea sa de sodiu — denumire comercială Hipaque — și sarea metilglucaminică — denumire comercială Renografin, produs românesc Odiston —) și ai acidului iotalamic (sarea de sodiu a acestuia: — denumire comercială Conray).

Diatrizoatul de sodiu marcat cu radioiod are o bună stabilitate radiochimică atît *in vitro* cît și *in vivo* [2]. Legarea de proteinele plasmatice este redusă, slabă, cu disociere rapidă [13]. Biocinetica studiată experimental la cîine sugerează o distribuție bicompartimentală [4]; la om curba dispariției plasmatice indică o distribuție multicompartimentală, caracterizată printr-o sumă de 3 sau 4 exponențiale [5]. Eliminarea glomerulară a PRF este atestată atît de corelația strînsă existentă între clearance-ul inulinei (C_{IN}) și cel al Na-diatrizoatului radioiodat (C_{DTZ}) cît și de verificările ce au exclus o eventuală participare tubulară [6]. Eliminarea extrarenală, în principal biliară, este foarte redusă la subiecții normali. Ponderea eliminării extrarenale crește pe măsura afectării filtrării glomerulare, eliminarea vicariantă biliară devenind semnificativă în insuficiențele renale avansate [7]. Eliminarea extrarenală se produce însă mult mai lent; la animalul nefrectomizat apar importante acumulări hepatice și pulmonare ale diatrizoatului injectat, iar epurarea plasmatică se efectuează cu un $T_{1/2}$ biologic de aproximativ 72 ore [8].

Cercetările de verificare a corelației dintre valorile C_{IN} și cele ale C_{DTZ} atestă ^{125}I-diatrizoatul drept un agent adecvat pentru testarea filtrării glomerulare. Coeficientul de corelație dintre C_{IN} și C_{DTZ} este semnificativ, iar ecuația dreptei de regresie ($C_{IN} = 0{,}99 \cdot C_{DTZ} + 3{,}42$) confirmă cvasiidentitatea comportării glomerulare a celor două produse [9]. ^{125}I-diatrizoatul rămîne în prezent unul dintre produsele cele mai larg verificate și utilizate pentru testarea filtrării glomerulare.

^{125}I-iotalamatul este de asemenea un bun agent de explorare glomerulară, cu valoare diagnostică confirmată atît pe plan metodologic [10] cît și la bolnavi cu variate grade de insuficiență renală [11]. Clearance-ul iotalamatului (C_{IOT}) este apropiat de cel al inulinei, corelația lor fiind definită de următoarea ecuație a dreptei de regresie: $C_{IN} = 1{,}02 \cdot C_{IOT} + 5{,}37$ [12].

6.1.2. VITAMINA B_{12} MARCATĂ CU RADIOCOBALT

Existența unor PRF bine definite, cu marcare intrinsecă și stabilitate radiochimică *in vivo* și *in vitro*, respectiv ^{58}Co — vit. B_{12} și ^{57}Co — vit. B_{12} a făcut ca descrierea eliminării exclusiv glomerulare a vit. B_{12} libere să

fie urmată de testări pe linia investigării filtrării glomerulare cu radiociancobalamină [13]. Inconvenientul principal, reprezentat de legarea proteică plasmatică a vit. B_{12}, s-a încercat a fi minimalizat prin blocarea transportorilor trans-cobalamină I şi II cu ajutorul unor doze mari de vit. B_{12} neradioactivă administrată parenteral [14]. Chiar în aceste condiţii nu există certitudinea că se asigură o biocirculaţie nelegată a radiociancobalaminei în organism, astfel încît determinările de filtrat glomerular sînt cel mai adesea inferioare valorilor C_{IN}. În practică s-au comunicat variaţii ale raportului $C_{B_{12}}/C_{IN}$ de la 0,43 la 0,99, explicate prin variabilitatea legării PRF de proteinele plasmatice ca urmare a schimbului izotopic petrecut în timpul efectuării investigaţiei [15]. Cu toate că teoretic clearance-ul radiociancobalaminei libere este exclusiv glomerular, acest PRF nu a putut găsi o utilizare largă în investigarea renală datorită imposibilităţii blocării totale şi de durată a trans-cobalaminelor.

6.1.3. RADIOCHELAŢI UTILIZAŢI ÎN INVESTIGAREA FILTRĂRII GLOMERULARE

Principalii radiochelaţi utilizaţi în prezent în explorarea nefrourologică sînt ^{51}Cr-EDTA, ^{99m}Tc-DTPA, ^{169}Yb-DTPA şi ^{113m}In-DTPA.

6.1.3.1. **^{51}Cr - EDTA.** Produsul se caracterizează printr-o foarte bună stabilitate atît *in vitro* cît şi *in vivo* [16]. Legarea PRF de proteinele plasmatice este slabă şi redusă ($< 2\%$), iar eliminarea renală este considerată de majoritatea autorilor drept exclusiv glomerulară [6, 17]. Datele care susţin existenţa unei participări tubulare în excreţia ^{51}Cr-EDTA sînt neconvingătoare [18]. O caracteristică biocinetică avantajoasă este absenţa eliminării sale extrarenale. Produsul se pretează atît la administrare intravenoasă cît şi la injectare subcutanată, caz în care se comportă ca o substanţă-depozit ce este eliberată lent în circulaţie, producînd concentraţii plasmatice relativ constante de-a lungul efectuării investigaţiei [19].

Numeroase studii de verificare a comportării clearance-ului renal al ^{51}Cr-EDTA (C_{CR}) în comparaţie cu C_{IN} sau alţi agenţi de investigare glomerulară atestă faptul că radiochelatul furnizează informaţii cantitative corect corelate cu valorile filtrării glomerulare. Cifrele C_{CR} sînt însă constant mai reduse, cu 5 — 15%, decît cele ale C_{IN} [6, 17, 20, 21, 22]. Pentru a echivala C_{CR} cu C_{IN} s-a propus fie multiplicarea primului cu constanta 1,073 [22], fie folosirea ecuaţiei dreptei de regresie $C_{IN} = 1{,}04\ C_{CR} + 0{,}27$ [20]. ^{51}Cr-EDTA reprezintă un produs de investigare a filtrării glomerulare ale cărui posibilităţi şi limite au fost stabilite clar, produs ce îşi păstrează locul între PRF utilizate în investigarea nefrologică [23, 24].

6.1.3.2. **^{99m}Tc - DTPA.** Denumire generică care include mai multe radioproduse, definite chimic şi diferenţiate biocinetic prin metoda de preparare în care rolul determinant pare a fi jucat de către agentul reducător utilizat la complexarea pertechnetatului.

^{99m}Tc-Fe-ascorbat-DTPA (nume comercial Renotec) reprezintă un pseudochelat, cu tropism tubular, util în vizualizarea renală statică dar neavenit pentru investigarea glomerulară [25]. ^{99m}Tc-Sn-DTPA [26] şi ^{99m}Tc-Cu-DTPA [27] sînt produse filtrate glomerular, de interes practic

Scanned with OKEN Scanner

deosebit, a căror radiofarmacologie nu a fost însă integral şi unanim precizată.

^{99m}Tc-Sn-DTPA are o stabilitate mediocră atît *in vitro* [27] cît şi *in vivo* [28]. Legarea de proteinele plasmatice este diferit apreciată, după autori, la 2 — 10% din doza administrată [15, 29]; legarea este foarte labilă, definită printr-o constantă de disociere de 1,4 — 10^7 [30]. Eliminarea renală a PRF pare a fi exclusiv glomerulară; participarea tubulară este considerată drept nesemnificativă [31]. Cercetările existente pledează pentru tratarea bicompartimentală a biocineticii chelatului; la om curba de dispariţie plasmatică înregistrează valori medii ale $T_{1/2}$ de 15 min pentru componenta rapidă şi de 126 min pentru cea lentă [32]. Testarea ^{99m}Tc-Sn-DTPA ca agent de investigare a filtrării glomerulare, efectuată prin compararea cu alte produse acreditate acestui scop, a dus la unele date discordante. Pe plan experimental, la cîine, primele rezultate comunicate găsesc cifre ale clearance-ului ^{99m}Tc-Sn-DTPA cu 18—20% mai scăzute decît cele ale C_{IN} [31]; cercetări ulterioare găsesc diferenţe de numai 8—10% între cele două clearance-uri [33]. În investigaţiile efectuate la om s-a atestat buna corelaţie dintre clearance-ul ^{99m}Tc-Sn-DTPA pe de o parte şi cel al creatininei [34], ^{125}I-iotalamatului [32] sau ^{51}Cr-EDTA [35] pe de altă parte, fără însă a se menţiona în toate studiile necesitatea unor corecţii de ordinul amintit la cercetările experimentale. În prezent, ^{99m}Tc-Sn-DTPA apare drept un produs încă insuficient stăpînit pe plan radiochimic, a cărui comportare biologică poate înregistra variaţii funcţie de producător sau chiar de şarjă. S-au adus argumente pentru necesitatea efectuării unui control biocinetic de calitate la fiecare şarjă destinată determinărilor de filtrare glomerulară [36]. Rezultatele diferite obţinute cu ^{99m}Tc-Sn-DTPA se explică prin variaţia purităţii radiochimice, prin modificări ale legării de proteinele plasmatice, ca şi prin gradul diferit de stabilitate *in vitro* şi *in vivo* al diferitelor truse de preparare. În condiţiile rutinei diagnostice a laboratoarelor de medicină nucleară, PRF respectiv trebuie să fie considerat drept un posibil agent de apreciere a valorii filtrării glomerulare şi nu de determinare riguroasă a acesteia. Rămîne de văzut în ce măsură ^{99m}Tc-Cu-DTPA va fi confirmat în viitor drept un înlocuitor superior al Sn-chelatului [27]; în mod cert însă interesul pentru ^{99m}Tc-DTPA rămîne constant, generat fiind de multitudinea aplicaţiilor sale diagnostice atît în investigarea glomerulară, cît mai ales în nefroangioscintigrafie (NAS) şi în nefroscintigrafia funcţională (NSF).

6.1.3.3. **Alţi radiochelaţi utilizaţi în investigarea filtrării glomerulare.** În acest subgrup sînt de reţinut ^{113m}In-DTPA şi ^{169}Yb-DTPA. Ambele produse au stabilitate superioară ^{99m}Tc-DTPA-ului atît *in vitro* cît şi *in vivo*, iar legarea de proteinele plasmatice este mai redusă.

Pentru ^{169}Yb-DTPA s-a confirmat excreţia exclusiv glomerulară a produsului ca şi corecta corelare cu valorile C_{IN}; PRF a dat satisfacţie într-o serie de cercetări efectuate fie din unghi metodologic [37, 38, 39], fie în scop de investigare funcţională [40, 41]. $T_{1/2}$ fizic mai lung al ^{169}Yb (32 zile) reprezintă un avantaj pe plan economic, nu se repercută negativ asupra mărimii iradierii organismului investigat dat fiind $T_{1/2}$ efectiv scurt, dar poate duce la contaminări persistente intraspitaliceşti prin urina radioactivă.

Scanned with OKEN Scanner

^{113m}In-DTPA este, de asemenea, atestat de o serie de lucrări drept un agent de investigare glomerulară corect corelat cu C_{IN} și C_{IOT} [42, 43, 44, 45].

6.1.4. APRECIERI ASUPRA UTILIZĂRII RADIOFARMACEUTICELOR CU EXCREȚIE GLOMERULARĂ

Prescripția diferențiată a acestor radioproduse este subordonată obiectivelor globale propuse în planul de explorare renală complexă a cazului dat. Atunci cînd interesează numai determinarea cantitativă a filtratului glomerular se vor prefera diatrizoatul sau iotalamatul radioiodat, agenți ce furnizează rezultate de încredere, cu iradieri reduse ale organismului (tabela 6.1). Faptul că aceste PRF își găsesc utilizare în medicina nucleară exclusiv pentru determinări de filtrat glomerular face ca ele să fie achiziționate în special de laboratoarele profilate pe explorarea nefro-urologică.

În cazul investigațiilor renale radioizotopice complexe, mai ales la nivelul laboratoarelor cu dotare tehnică adecvată, se impune folosirea ^{99m}Tc-DTPA care permite atît vizualizarea dinamicii vasculare parenchimatoase și de căi excretorii, cît și aprecierea filtrării glomerulare Iradierea organismului produsă la activitățile administrate pentru aseme nea explorări (tabela 6.1) este justificată de valoarea medicală a informa țiilor obținute. În fapt datele de vizualizare dinamică rezultînd din folos rea ^{99m}Tc-Sn-DTPA sînt mai apreciate decît valorile clearance-ului glome rular obținute cu acest agent, întrucît nu dispunem întotdeauna de un produs cu comportare biocinetică riguros reproductibilă.

Faptul că ^{99m}Tc-Sn-DTPA are multiple utilizări în medicina nucleară duce la menținerea acestuia în practica curentă, cu toate imperfecțiunile ce îi sînt uneori imputate. Superioritatea biocinetică a ^{113m}In-DTPA pe planul clearance-ului glomerular nu pare a fi suficientă pentru compensarea dezavantajelor energetice ale ^{113m} In în cazul folosirii camerelor de scintilație tip Anger; produsul rămîne un agent diagnostic de compromis rezervat în special laboratoarelor ce nu utilizează curent PRF marcate cu ^{99m}Tc.

6.2. RADIOFARMACEUTICE CU TROPISM PREDOMINANT TUBULAR

Această grupă include atît produsele utilizate în *explorarea funcțională* tubulară (ortoiodohipuratul radioiodat), cît și substanțe folosite în *vizualizarea statică* renală.

6.2.1. ORTOIODOHIPURATUL RADIOIODAT

Ortoiodohipuratul radioiodat (nume comercial radiohipuran), sintetizat de Tubis și colab. [49] s-a impus în explorarea radionefrologică dovedindu-și superioritatea față de alți agenți tubulari testați anterior. În prezent ^{131}I-ortoiodohipuratul (^{131}I-OIH) este produsul cel mai larg utilizat, în comparație cu ^{123}I-OIH și ^{125}I-OIH.

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 6.1

Iradierea produsă prin PRF cu excreție predominant glomerulară

Radiofarmaceutic	Activitate administrată	Iradiere (mrad/investigație)				Bibliografie	Observații
		întreg corp	rinichi	vezica urinară	gonade		
^{131}I-diatrizoat ^{131}I-iotalamat	50 microCi	1	20	35	1	[46]	iradierea vezicală, după [45]
^{57}Co-vit.B_{12}	2 microCi	8	0,2	—	0,12	[15]	organ critic ficatul, primind 6,3 mrad/investig. [48]
^{51}Cr-EDTA	200 microCi	0,4	6	4	2,6	[15]	iradierea vezicală, după [45]
^{169}Yb-DTPA	50 microCi	1	7	30	1	[46]	iradierea vezicală, după [45]
^{99m}Tc-DTPA	10 miliCi	100	500—3000	4000—6000	100—200	[47]	activitatea de 10 miliCi este necesară investigațiilor complexe la camera de scintilație; pentru determinarea exclusivă a filtratului glomerular activitățile administrate, respectiv iradierile sînt de 20 de ori mai reduse
		160	400	5500	190	[46]	
		40	—	800	80	[45]	
^{113m}In-DTPA	10 miliCi	100—200	—	3000—6000	200	[47]	
		90	—	2000	90	[45]	

Scanned with OKEN Scanner

Calitatea medicală a rezultatelor obținute cu ^{131}I-OIH este condiționată de puritatea sa radiochimică, procentul de radioiod liber trebuind să fie mai mic de 1%. Numeroase lucrări atenționează asupra valorii crescute a acestui procent în unele produse comerciale ca și asupra faptului că stabilitatea în timp a ^{131}I-OIH poate fi foarte diferită, funcție de producător [50, 51]. S-a propus biotestarea experimentală a comportării renale drept modalitate de control al calității pentru fiecare șarjă de ^{131}I-OIH destinată investigațiilor nefrologice riguroase [52]. Sugestia de a se înlocui forma *orto-* cu forma *meta-* a produsului, care dovedește o stabilitate radiochimică mult mai bună, nu a găsit încă ecou practic [53].

Comportarea ^{131}I-OIH în organismul animal și uman a fost investigată extensiv. Sistemele propuse pentru modelarea biocineticii sale cuprind între două și șapte compartimente [54, 55]. De cea mai largă acceptare și utilitate practică se bucură modelul bicompartimental deschis [54, 56, 57, 58].

Analiza comportării prerenale a ^{131}I-OIH precum și aspectele legate de eliminarea renală a trasorului sînt esențiale pentru farmacocinetica compusului.

Ca un prim aspect al comportării prerenale intră în discuție legarea ^{131}I-OIH de proteinele plasmatice, proces diferit apreciat funcție de tehnica folosită pentru testare : absența legării proteice [58], legări de 1,1 — 20% [59], de 33% [60] sau 70% [9]. Interesantă apare abordarea lui Britton [61] care apreciază legarea proteică într-o optică funcțională, corelată cu comportarea renală *in vivo* a trasorului, conchizînd că din punctul de vedere al sistemului tubular legarea proteică plasmatică a ^{131}I-OIH reprezintă aproximativ 17%, în timp ce pentru sistemul glomerular cifra este de 70%.

Pătrunderea trasorului în eritrocite, la concentrațiile plasmatice mici utilizate în studiile radioizotopice, este de 0,08 — 0,2%; nu se produce fixarea hipuranului pe hemoglobină, astfel încît retrodifuzia plasmatică este liberă și rapidă [61].

În ceea ce privește excreția biliară a radiofarmaceuticului aceasta este neglijabilă, înregistrînd valori mult mai mici de 1% din doza administrată. Utilizînd un produs de calitate adecvată cantitatea de ^{131}I captată de tiroidă rămîne nesemnificativă [59].

Eliminarea renală a radiohipuranului se efectuează în procent de 20% prin filtrare glomerulară și de 80% prin secreție tubulară activă [58]. Secreția se produce la nivelul celulelor tubului contort proximal, procesul de transfer intraluminal fiind cantitativ și foarte rapid; la aproximativ 15 secunde de la injectarea ^{131}I-OIH în artera renală se poate demonstra autohistoradiografic prezența trasorului în lumenul tubular [61]. Secreția tubulară a hipuranului este un proces metabolic activ, cu mecanisme comune pentru o serie de substanțe excretate la acest nivel; de aici inhibiția competitivă a C_{OIH} la administrarea unor cantități mari de PAH, probenecid sau iodopiracet [57, 58, 61].

Radiohipuranul circulă în continuare — fără alte interacțiuni metabolice — de-a lungul sistemului tubular și a canalelor colectoare pînă în pelvisul renal [57]; substanța este excretată prin căile urinare în vezică și apoi eliminată din organism prin micțiune.

Secreția tubulară a radiofarmaceuticului constituie momentul biocinetic semnificativ pentru utilizarea sa în explorarea hemodinamicii renale. Radiohipuranul — administrat în scop diagnostic în microcantități ce nu depășesc capacitatea funcțională de transfer tubular — recunoaște drept

Scanned with OKEN Scanner

factor determinant al epurării sale renale aportul local de substanţă; acest proces este determinat tocmai de mărimea fluxului plasmatic renal care poate fi deci explorat prin determinarea C_{OIH}. Validarea C_{OIH} drept metodă de determinare a fluxului plasmatic efectiv renal s-a efectuat prin explorări simultane cu „standardul de comparaţie" [9] unanim acceptat, clearance-ul acidului paraaminohipuric (C_{PAH}) ale cărui valori normale sînt de 654 ± 163 ml/min la bărbat şi 529 ± 163 ml/min la femeie [1]. O serie largă de lucrări tabelate de Mailloux şi Gagnon [62], atestă buna corelaţie dintre rezultatele celor două clearance-uri; raportul C_{OIH}/C_{PAH} înregistrează la om valori subunitare variind, după diferiţi autori, între 0,8 şi 0,96. Explicaţia cifrelor mai scăzute obţinute prin C_{OIH} radioactiv faţă de C_{PAH} este dată atît de legarea proteică plasmatică diferită, cît şi de prezenţa ^{131}I liber; s-a demonstrat că un procent de 5% ^{131}I anorganic impurificînd ^{131}I-OIH produce o scădere de 49% a valorilor C_{OIH} [51, 62]. Practicat în condiţii corecte, C_{OIH} se dovedeşte o metodă de încredere, în aprecierea debitului efectiv plasmatic renal [61, 62, 63].

De o largă utilizare practică se bucură radiohipuranul şi în efectuarea radionefrogramei izotopice (RNI), metodă ce traduce grafic, pentru fiecare rinichi în parte, aspecte complex integrate din circuitul radiofarmaceuticului prin vasele, ţesuturile şi căile excretorii renale. Tehnologia şi interpretarea acestei metode de explorare sînt tratate monografic în lucrări de specialitate [46, 57, 61].

La atributele farmacocinetice ale radiohipuranului datorită cărora sînt posibile explorări neinvazive cu certă valoare diagnostică se adaugă şi avantajul iradierii reduse produsă prin ^{131}I-OIH. Într-adevăr, investigaţiile curente (determinările de debit efectiv plasmatic renale sau radionefrograma izotopică) necesită administrarea a 25 μCi ^{131}I-OIH implicînd o iradiere foarte redusă a organismului (vezi tabela 6.2). Iradierea creşte în cazul utilizării unor activităţi de circa 10 ori mai mare, impuse de tehnicile de vizualizare dinamică la camera de scintilaţie (nefroscintigrafia funcţională); de asemenea, retenţia prelungită a PRF în organism în cazul insuficienţelor renale cronice decompensate duce la creşterea iradierii [64].

6.2.2. RADIOFARMACEUTICE CU TROPISM PREDOMINANT TUBULAR UTILIZATE ÎN VIZUALIZAREA RENALĂ

Grup de radioproduse reprezentat iniţial de agenţii organomercuriali, cărora li se adaugă însă, în ultimii ani, PRF de vizualizare nefrotubulară marcate cu ^{99m}Tc.

6.2.2.1. Radiofarmaceutice organomercuriale. Includ diuretice mercuriale marcate cu ^{203}Hg şi ^{197}Hg, produsul de vizualizare reprezentativ fiind clormerodrinul (nume comercial Neohidrin).

Radioclormerodrinul, ca prim agent de scintigrafie renală, păstrează importanţă prin faptul că majoritatea datelor fundamentale privind această tehnică au fost acumulate cu respectivul produs. Marcarea cu ^{203}Hg a clormerodrinului a fost părăsită, din considerente radiobiologice, în favoarea ^{197}Hg [65].

Dispariţia din sînge a PRF injectat intravenos este relativ rapidă, recunoscîndu-i-se trei exponenţiale, cu $T_{1/2}$ biologic de 12 min, 3 ore şi 12 ore, componentele interesînd respectiv 83, 16 şi 0,8% din activitatea totală injectată [66].

Scanned with OKEN Scanner

Organomercurialele au o afinitate deosebită pentru grupările — SH, aşa încît 98% din clormerodrinul plasmatic circulă legat de proteine, în principal α_2 şi β globuline; 20—30% din radioactivitatea sanguină este legată de eritrocite, cu localizare preferenţială pe grupările sulfhidril ale membranei [68].

PRF este concentrat de celulele tubulare proximale renale, cu atingerea unui platou de echilibru după 2—3 ore de la injectarea intravenoasă, interval de timp în care circa 45% din activitatea administrată se acumulează în cortexul celor doi rinichi. Concentraţia radioactivităţii corticale este de 5—13 ori mai mare decît cea a medularei renale [67]. Radiofarmaceuticul nu are localizare şi eliminare exclusiv renală; aproximativ 15% din doza administrată se depozitează în ficat, de unde, cu un $T_{1/2}$ biologic de aproximativ 40 de zile este apoi eliminată biliar.

Eliminarea urinară a radioclormerodrinului depozitat în cortexul renal se face în proporţie de 38% cu $T_{1/2}$ biologic de 8 ore dar aproximativ 8—20% din doză are un $T_{1/2}$ biologic lung, de 30 zile [67]. Rezultă că dacă biocinetica PRF este avantajoasă pentru vizualizarea renală, în schimb pe plan radiobiologic produsul este critic dependent de caracteristicile fizice ale radiomercurului utilizat la marcare. Astfel, retragerea ^{203}Hg-neohidrinului de pe lista produselor aprobate pentru diagnosticul medical [65] este justificată atît de calculele dozimetrice ce cuantifică iradierea crescută (vezi tabela 6.2), cît şi de datele experimentale ce atestă apariţia de leziuni histologice tubulare după utilizarea lui [69]. ^{197}Hg-neohidrinul deşi are avantajul unei iradieri cu un ordin de mărime mai mic, este handicapat atît de caracteristicile emisiei fotonice, puţin satisfăcătoare în vizualizarea renală ca şi de faptul că puritatea radiochimică a livrărilor comerciale este deseori inadecvată, contaminantul principal fiind tocmai ^{203}Hg.

6.2.2.2. Radiofarmaceutice marcate cu ^{99m}Tehnețiu. Servituţile compuşilor organomercuriali au impulsionat cercetările pentru găsirea unor PRF marcate cu ^{99m}Tc, adecvate vizualizării tubulorenale. Din multitudinea de compuşi propuşi şi testaţi amintim ^{99m}Tc-Fe-ascorbatul [70], ^{99m}Tc-penicilinamin-acetazolamid [71], ^{99m}Tc-Sn-gluconatul [72], ^{99m}Tc-Sn-tioglucoza [73]; preferinţele prezente se îndreaptă către doi compuşi, anume ^{99m}Tc-Sn-glucoheptonatul (Tc-G Hpt.) şi ^{99m}Tc-Sn-ac. dimercaptosuccinic (Tc-DMS).

Pe plan farmacocinetic ambii compuşi prezintă o legare proteică plasmatică importantă, apreciată la 50% pentru Tc-G Hpt. şi 75% pentru Tc-DMS [74]. Epurarea plasmatică este evident mai rapidă pentru primul compus. La om, tratînd triexponenţial dispariţia plasmatică a trasorului, rezultă următorii $T_{1/2}$ biologici cu respectivele contribuţii procentuale la procesul de epurare: pentru Tc-G Hpt. 5 min — 84%, 60 min — 10%, 24 h — 6%; pentru ^{99m}Tc-DMS 20 min — 44%, 50 min — 44% şi 18 ore — 12%.

Intervalul de timp prezentînd interes diagnostic, 90 — 120 minute de la injectare, înregistrează o radioactivitate plasmatică dublă la ^{99m}Tc-DMS faţă de ^{99m}Tc-G Hpt. cu implicaţiile de rigoare asupra fondului tisular [74].

Acumularea renală avantajează însă ^{99m}Tc-DMS care ajunge la un procent de 44% fixat intrarenal (cu un $T_{1/2}$ biologic de acumulare de 60 min) faţă de ^{99m}Tc-G Hpt. care atinge numai 15% (cu un $T_{1/2}$ biologic de acumulare de 15 min). Ambele PRF sînt captate de celulele tubulare proximale, posibil şi cele distale, realizîndu-se deci concentraţii radioactive net

Scanned with OKEN Scanner

superioare în corticala rinichilor față de zona lor medulară. Eliminarea urinară a ^{99m}Tc-DMS este mult mai lentă decît cea a ^{99m}Tc-G Hpt.; la două ore de la injectare fracțiunea excretată urinar se cifrează la 16% și respectiv 50% din radioactivitatea totală injectată.

Din datele biocinetice de mai sus [74] ca și din experiența clinică existentă [75, 76, 77], ^{99m}Tc-DMS apare drept un PRF adecvat vizualizării parenchimatoase renale de tip static, furnizînd detalii morfologice semnificative îndeosebi pentru zona corticală. Vizualizarea optimă, fără interferență de căi urinare, se efectuează la 2—6 ore de la injectare, intervalul fiind determinat de starea funcțională renală. ^{99m}Tc-G Hpt. este de asemenea un bun agent de vizualizare parenchimatoasă, cu urmărirea imaginilor la 1—3 ore de la administrare; procentul important de radioactivitate eliminată rapid prin urină permite obținerea de informații privind tranzitul pelvi-caliceal, la 10—15 minute de la injectare. Alături de aportul acestor PRF ca agenți de vizualizare statică, ambii produși, dar în special ^{99m}Tc-G Hpt. pot fi injectați ca „bolus radioactiv", la activitățile ce se folosesc pentru efectuarea angioscintigrafiilor aortorenale, deci spectrul lor de utilizare diagnostică este evident mai larg decît al compușilor organomercuriali.

Iradierea produsă de ^{99m}Tc-DMSA este superioară celei a ^{99m}Tc-G Hpt.; ambii compuși însă, la un aport diagnostic net superior, produc iradieri ce se compară favorabil cu cele ale ^{197}Hg-neohidrinului (tabela 6.2). ^{99m}Tc-

TABELA 6.2

Iradierea organismului prin radiofarmaceutice cu tropism predominant tubular (mrad/investigație

Radiofarmaceutic	Activitate uzual administrată	Întreg corpul	Rinichi		Gonade	Vezică	Bibliografie
			cortex	medulară			
^{131}I-*o*-iodohipurat	25 μCi	4	9		4—16	—	[46]
^{203}Hg-clormerodrin	200 μCi	—	20 000	4 000	150	420	[67]
^{197}Hg-clormerodrin	250 μCi	—	3 000	350	10	275	[67]
^{99m}Tc-DMS							
Nefroangioscintigramă	10 mCi	160	7 600		220	2 800	[74]
Nefroscintigramă statică	2 mCi	32	1 600		45	560	[74]
^{99m}Tc-G Hpt.							
Nefroangioscintigramă	10 mCi	80	2 000		200	8 000	[74]
Nefroscintigramă statică	5 mCi	40	1 000		100	4 000	[74]

glucoheptonatul și ^{99m}Tc-ac. dimercaptosuccinic, prin radionuclidul de marcare adecvat tehnologiei moderne de vizualizare scintigrafică, prin caracteristicile farmacocinetice avantajoase, prin multiplele lor posibilități de aplicare în diferite domenii ale medicinei nucleare se impun drept produse accesibile și adecvate pentru stadiul actual al vizualizării renale, de emisie.

6.3. INDICAȚII DE UTILIZARE A RADIOFARMACEUTICELOR ÎN EXPLORAREA NEFRO-UROLOGICĂ

6.3.1. INDICAȚII TEHNICO-METODOLOGICE

Pe plan tehnico-metodologic progresele înregistrate în domeniul PRF, concordante cu evoluția aparaturii de vizualizare — prelucrare automată a datelor, au determinat modificări în conceptele de investigație radioizotopică care, tributare metodologiei clasice, aveau tendința de a identifica fiecare tehnică cu explorarea unei anumite funcții renale, cu un anumit radiofarmaceutic. În prezent se impune noțiunea de PRF plurivalent, care folosit în condiții tehnico-metodologice apropriate duce la obținerea de multiple informații diagnostice, funcționale și morfologice, ce integrează complex etape succesive din activitatea aparatului urinar. O încercare sintetică de a cuprinde indicațiile PRF curent utilizate în tehnicile de explorare nefro-urologică este prezentată în tabela 6.3.

În ceea ce privește investigarea simultană sau secvențială prin PRF marcate cu radionuclizi diferiți, aceasta este favorizată atît de caracteristicile fizice (spectre energetice gamma diferite ale ^{125}I, ^{99m}Tc și ^{131}I, permițînd cuplarea concomitentă a unor investigații efectuate cu două radiofarmaceutice; $T_{1/2}$ fizic scurt al ^{99m}Tc și ^{113m}In permițînd cuplarea succesivă a unor explorări), cît și de $T_{1/2}$ efectiv scurt al majorității agenților utilizați (exceptînd vizualizările statice efectuate cu produse organomercuriale).

6.3.2. INDICAȚII DE UTILIZARE ÎN PATOLOGIA APARATULUI URINAR

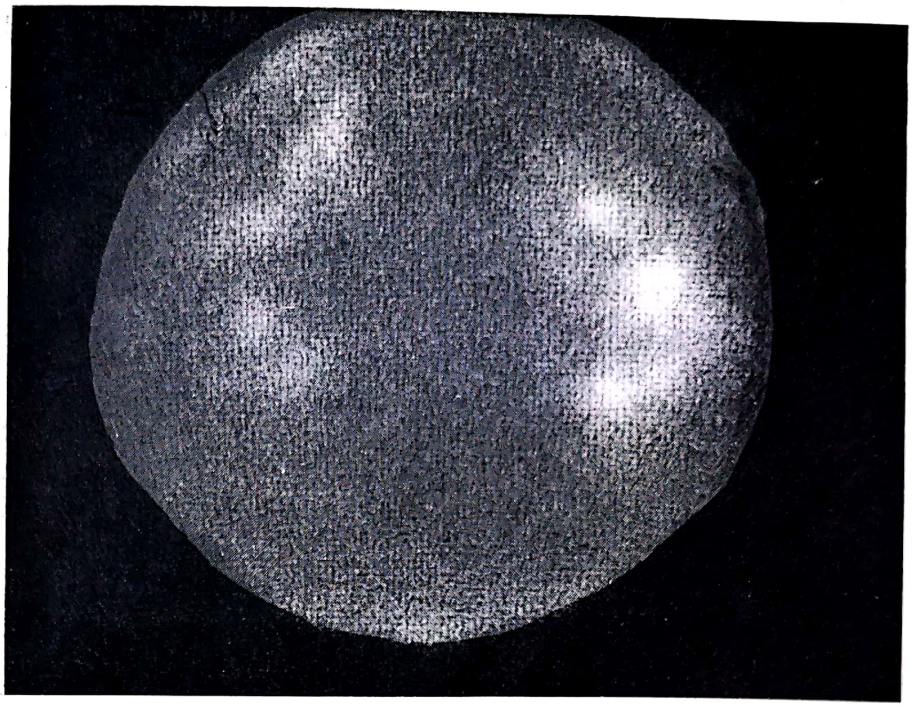
Nefropatiile difuze de diverse etiologii: diatrizoatul sau iotalamatul marcate cu ^{125}I și ^{131}I-*o*-iodohipuratul sînt agenții de elecție în stabilirea bilanțului funcțional glomerular și tubular, prin efectuarea simultană a respectivelor clearance-uri. PRF permit înlocuirea metodelor clasice de clearance, laborioase și uneori imprecise, prin tehnici rapide și exacte.

Hipertensiunea arterială în care ^{131}I-OIH și ^{99m}Tc-DTPA sînt PRF de utilizare majoră în diagnosticul pozitiv și diferențial (teste folosite RNI sau NSF), diagnosticul pozitiv al hipertensiunii reno-vasculare (NAS), stadializarea și bilanțul funcțional de etapă, urmărirea evoluției sub tratament (Cl_g, Cl_t, RNI). În suspiciuni de ischemie renală segmentară își poate dovedi valoarea și ^{99m}Tc-G Hpt. (NAS + NSS).

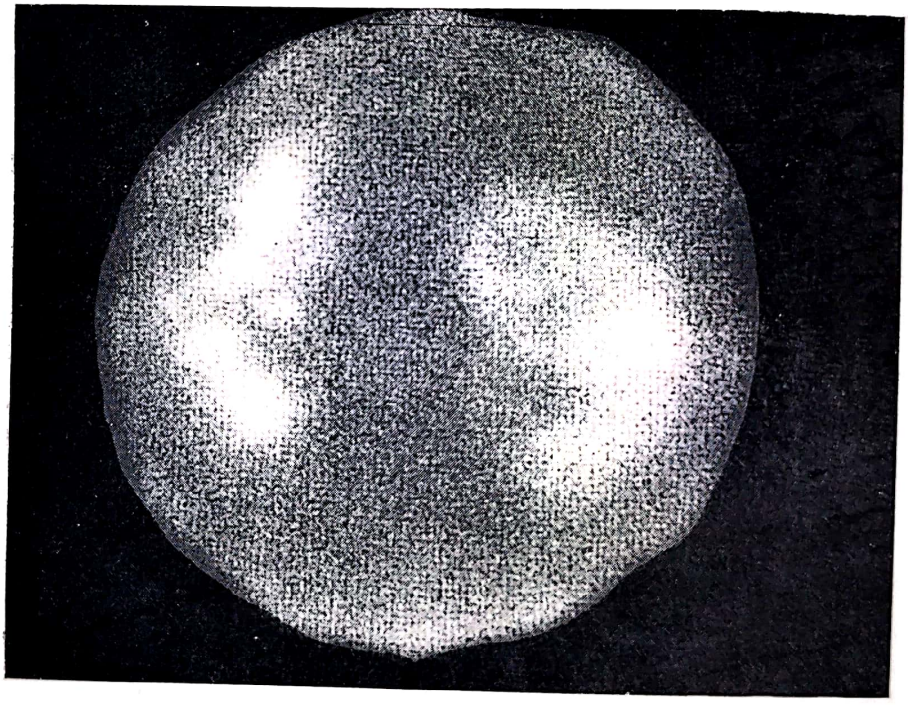
Uropatiile obstructive au indicație majoră pentru explorarea cu ^{131}I-OIH (minimum RNI dar preferabil NSF) care obiectivizează prezența și gradul de obstrucție, răsunetul funcțional pe parenchimul tubular, starea funcțională a rinichiului controlateral (în cazul uropatiilor obstructive unilaterale), reversibilitatea leziunilor după tratament medical sau chirurgical. În rinichiul unic chirurgical cu uropatie obstructivă NSF cu ^{131}I-OIH rămîne investigația neinvazivă de rutină.

Insuficiențele renale cronice necesită în primul rînd bilanț funcțional prin Cl_g și Cl_t. Dacă sînt necesare informații morfologice ^{197}Hg-clormerodrinul este inadecvat întrucît excreția sa în aceste cazuri se produce mai ales pe cale hepato-biliară; NSS este realizabilă cu ^{131}I-OIH și radiochelații ^{99m}Tc sau ^{113m}In.

Scanned with OKEN Scanner



a



b

Fig. 6.1. — Vizualizare cu două PRF în explorarea rinichiului polichistic :
(*a*) ^{99m}Tc-gluconat, PRF tubulotrop, evidențiind chistele intrarenale ca zone hipofixante,
(*b*) ^{99m}Tc-DTPA, PRF glomerulotrop, evidențiind aceleași imagini chistice ca zone de acumulare crescută.
Concluzii : rinichi polichistic ; chiste glomerulare.

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 6.3

Utilitatea unor radiofarmaceutice în tehnicile de explorare nefro-urologică

Radiofarmaceutic	Nefroangio-scintigrama (NAS)	Clearance renal		Radionefrogramă izotopică (RNI)	Nefroscintigramă statică (NSS)	Nefroscintigramă funcţională (NSF)
		glomerular (Cl_g)	tubular (Cl_t)			
^{125}I-diatrizoat	—	cantitativ riguros	—	—	—	—
^{169}Yb-DTPA	—	cantitativ	—	rar utilizat	—	—
^{99m}Tc-Sn-DTPA	vizualizări de bună calitate	incert cantitativ	—	utilizat	—	agent de electie în prezent
^{113m}In-DTPA	vizualizări de calitate mediocră	cantitativ	—	rar utilizat	—	utilizat
^{131}I-*o*-iodohipurat	—	—	cantitativ	agent de electie (20—50 μCi)	numai în insuficiente renale cronice avansate	utilizare curentă (300—500 μCi)
^{197}Hg-clormerodrin	—	—	test cantitativ de acumulare	—	utilizare curentă	—
^{99m}Tc-glucoheptonat	vizualizări de bună calitate (8—10 mCi)	—	apreciere calitativă	—	vizualizări de bună calitate (5mCi)	utilizabil cu rezultate mediocre
^{99m}Tc-dimercapto-succinat	vizualizări de bună calitate (8—10 mCi)	—	apreciere calitativă	—	vizualizări de bună calitate (2 mCi)	—

Scanned with OKEN Scanner

Modificările morfologiei renale şi în special formaţiunile ocupatoare de spaţiu beneficiază de investigarea cu ^{197}Hg-clormerodrin (NSS) sau ^{99m}Tc-DMS.

În cazurile în care sînt necesare informaţii detaliate asupra perfuziei formaţiei ocupatoare de spaţiu se indică folosirea ^{99m}Tc-G Hpt. sau ^{99m}Tc-DMS injectate în „bolus radioactiv" de 10—15 mCi pentru efectuarea NAS + NSS. Aceleaşi radiofarmaceutice, dar la activităţi de 3—5 ori mai mici sînt indicate pentru NSS necesară stabilirii poziţiei, formei, dimensiunilor sau anomaliilor congenitale renale (fig. 6.1).

Traumatismele renale şi urgenţele vasculo-renale sînt explorabile în faza acută cu ^{99m}Tc-DTPA sau ^{99m}Tc-G Hpt. (NAS + NSF), pentru ca în urmărirea evoluţiei sau în faza sechelară să necesite evaluări funcţionale complexe cu ^{131}I-OIH şi ^{99m}Tc-DTPA (sau ^{99m}Tc-G Hpt.).

Transplantul renal devine o condiţie clinică tot mai frecvent tributară explorării radioizotopice. Urmărirea apariţiei posibilelor complicaţii se efectuează pe multiple verigi, dintre care cea vasculară şi tubulară sînt obiectivizabile prin ^{99m}Tc-DTPA (NAS) şi ^{131}I-OIH (Cl_t şi NSF).

^{131}I-fibrinogenul poate semnala iminenţa rejecţiei atunci cînd radiofarmaceuticul se acumulează la nivelul rinichiului transplantat [78].

Intoleranţă la substanţe de contrast radioopace iodate dirijează fortuit bolnavul către vizualizările nefro-urologice de emisie, caz în care, funcţie de patologia existentă, se indică investigaţiile izotopice şi PRF apropriate.

Indicaţiile schiţate mai sus reprezintă un cadru general de utilizare a PRF în explorarea renală; se detaşează drept agenţi diagnostici de prim ordin ^{125}I-diatrizoatul, ^{99m}Tc-DTPA, ^{131}I-OIH şi ^{99m}Tc-G Hpt. Este evident faptul că nu dispunem de un PRF plurivalent capabil să acopere integral explorarea radioizotopică a aparatului urinar şi că, dată fiind complexitatea funcţională renală, se impune utilizarea simultană sau succesivă a cel puţin doi radioproduşi, aleşi cu competenţă şi folosiţi în condiţiile unor dotări tehnico-medicale corespunzătoare.

BIBLIOGRAFIE

1. H.W. Smith, „Principles of Renal Physiology", Oxford University Press, New York, 1956.
2. T. Dennenberg, *Acta Med. Scand.*, supl. 442 (1965).
3. E.C. Laser, R.S. Farr şi colab., *Amer. J. Roentgenol.*, **87**, 338 (1962).
4. M.D. Blaufox, D.R. Sanderson, W.N. Tauxe şi colab., *Amer. J. Physiol.*, **204**, 536 (1963).
5. C. Bianchi, *Minerva Nucl.*, **5**, 157 (1961).
6. C.Bianchi, „Measurement of the glomerular filtration rate", în „Progr. Nucl. Med.", vol. 2, p. 21, S. Karger, Basel, 1972.
7. M.J. Chamberlain, T. Sherwood, *Br. J. Radiol.*, **39**, 765 (1966).
8. H.C. Siemensen, N.J. Augustin, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **8**, 22 (1973).
9. F.T. Maher, W.N. Tauxe şi colab., *Mayo Clin. Proc.*, **45**, 700 (1970).
10. H. Pixberg, P. Hilger, F. Zielske, *Fortschr. Rontgenstr.*, **111**, 108 (1969).
11. P.E. Skov, *Acta Med. Scand.*, **187**, 419 (1970).
12. F.T. Maher, N.G. Nolan, L.R. Elveback, *Mayo Clin. Proc.*, **46**, 690 (1971).
13. W.B. Nelp, N.N. Wagner, R.C. Reba, *J. Lab. Clin. Med.*, **63**, 480 (1964).
14. A. Breckenbridge, A. Metcalfe Gibson, *Lancet*, **2**, 265 (1965).
15. L.R.Chervu, L. Freeman, M.D. Blaufox, *Sem. Nucl. Med.*, **4**, 3 (1974).
16. W.G. Myers, C.F. Diener, *J. Nucl. Med.*, **1**, 124 (1960).
17. B.D. Stacy, G.D. Thorburn, *Science*, **152**, 1076 (1966).
18. K. Sliz, A. Oppelt şi colab., în „Dynamic studies with radioisotopes in medicine", p. 347, IAEA, Vienna, 1971.
19. G. Riccabona, P. Dittrich şi colab., *Nucl. Medizin*, **9**, 242 (1970).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

RADIOFARMACEUTICE FOLOSITE ÎN INVESTIGAREA APARATULUI DIGESTIV

DE

Dr. GH. JOVIN

Investigaţiile cu PRF folosite astăzi în diagnosticul afecţiunilor digestive şi acceptate unanim ca investigaţii de uz curent sînt :

— scintigrafia hepatică cu coloizi radioactivi şi determinarea clearance-ului kupfferian ca măsură a debitului sanguin hepatic ;

— scintigrama hepato-biliară cu substanţe excretate prin bilă, tip roz bengal, sau BSP în scopul investigaţiei morfofuncţionale a căilor biliare ; pentru aceleaşi substanţe se determină epurarea lor din sînge ca test al funcţiei hepatocitare ;

— scintigrama şi explorarea funcţională a pancreasului cu amino-acizi marcaţi, singurul PRF folosit în mod curent fiind ^{75}Se-metionina ;

— investigaţia absorbţiei intestinale cu grăsimi marcate sau cu vit. B_{12} radioactivă ;

— diagnosticul exudaţiei proteice în intestin cu radioproteine sau cu macromolecule marcate ;

— diagnosticul hemoragiilor digestive oculte cu hematii marcate cu ^{51}Cr ;

— investigaţia motricităţii gastrice şi a refluxului gastro-esofagian cu PRF nerezorbabile (coloizi radioactivi, DTPA-marcat etc.).

Parte din PRF folosite pentru aceste investigaţii sînt comune şi altor organe, în special sîngelui şi sistemului reticuloendotelial. Vor fi discutate mai jos PRF folosite cu precădere în explorarea aparatului digestiv.

7.1. RADIOCOLOIZII FOLOSIŢI ÎN INVESTIGAREA FICATULUI

Iniţial ^{198}Au s-a impus ca agent de elecţie în investigaţia hepatică cu radiocoloizi cu atît mai mult cu cît durata de viaţă relativ scurtă (2,7 zile) permitea administrarea unor doze suficient de mari [1, 2, 3]. În acelaşi timp, durata de viaţă era suficient de lungă pentru a permite, cu pierderi rezonabile, un transport de cîteva zile de la locul preparării pînă la unitatea medicală care îl folosea.

Înlocuirea ^{198}Au coloidal a fost încercată iniţial fără succes, prin microagregate de serumalbumină umană marcate cu ^{131}I, dar ulterior apariţia radioizotopilor cu $T_{1/2}$ fizic scurt a dus la introducerea unor coloizi marcaţi cu ^{99m}Tc sau ^{113m}In care au luat locul ^{198}Au coloidal în scintigrafia hepatică.

Radiocoloizii folosiţi în explorarea diagnostică a ficatului sînt microparticule cu diametre variabile între 20—40 mμ (aur coloidal) şi 1000—4000 mμ (sulfocoloid de techneţiu). Aceste particule sînt fagocitate de către macrofagele fixe şi mobile printr-un mecanism analog fagocitozei bacteriilor, a resturilor celulare sau a oricărei particule recunoscută ca străină de organism. Utilizarea lor în explorarea ficatului se bazează pe faptul că la omul normal 80—90% din coloidul injectat este captat în ficat de macrofagele care delimitează sinusoidul hepatic (celulele Kupffer), 2—8% fiind captat în splină, aproximativ 8% în măduva osoasă, iar restul fiind distribuit în plămîni, ganglioni limfatici şi macrofage circulante. Factorii care determină această distribuţie ţin pe de o parte de caracteristici ale organului ţintă, pe de altă parte de caracteristicile particulelor coloidale [4]. Trebuie subliniat că nu există o concepţie unitară unanim admisă asupra mecanismului care determină fagocitoza particulelor coloidale.

A. Factorii care ţin de organul ţintă sînt :

a) *Debitul sanguin al organului.* Este poate factorul determinant major în distribuţia radiocoloidului după injectare. Dealtfel raportul între procentul fixat în ficat faţă de splină reflectă oarecum raportul între debitele sanguine ale celor două organe, creşterile captării splenice fiind în raport direct cu creşterea debitului sanguin splenic [5]. Legată de factorul circulator este şi densitatea de celule reticulo-endoteliale precum şi posibilitatea de contact între particulele coloidale şi aceste celule. S-a constatat încă de la începutul folosirii radiocoloizilor în studiul ficatului că aproximativ 90% din coloidul care ajunge în ficat este reţinut la prima trecere, ceea ce a determinat dealtfel încercările de măsurare a debitului sanguin hepatic cu radiocoloizi. Nu există date tot atît de clare în privinţa splinei dar considerînd structura anatomică şi distribuţia macrofagelor în splină este probabil că extracţia la subiectul normal să fie mai mică decît cea hepatică.

b) *Starea funcţională a sistemului reticulo-endotelial* (*SRE*) . Este un factor foarte frecvent menţionat dar foarte puţin definit. Nu sînt descrişi factori, în afara celor care ţin de particulele fagocitare, care să influenţeze cu certitudine capacitatea funcţională a SRE, iar pe de altă parte acesta din urmă este unul din ţesuturile cu mare rezistenţă la noxe. Este posibil ca această „capacitate funcţională" a SRE să ţină de creşterea numărului de celule (hiperplazie), de reducerea cantitativă a ţesutului (în scleroze sau fibroze) sau, în fine, de creşterea debitului sanguin local care aducînd mai multe particule coloidale obligă macrofagele la o activitate crescută.

B. Factorii care ţin de particulele fagocitare :

a) *Dimensiunile particulelor.* Există o variaţie a dimensiunilor particulelor în funcţie de preparat : aurul coloidal are, în general, particule cu diametrul de 20—40 mμ, în timp ce particulele de ^{99m}Tc sulfocoloid sau de ^{113m}In-coloidal sînt de 300 — 1500 mμ. Influenţa dimensiunilor se traduce printr-o epurare sanguină ceva mai rapidă în cazul particulelor mari care sînt acumulate în cantităţi mai mari în splină (8—9% Tc-coloid faţă de 2—3% Au coloidal la subiectul normal).

Întrucît nu s-a lucrat cu diferite dimensiuni de particule coloidale ale aceluiaşi preparat, rolul propriu-zis al mărimii particulelor nu este întrutotul limpede.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Structura particulelor*. Încărcătura electrică a particulelor coloidale exprimată prin mobilitatea electroforetică a coloidului precum și caracteristici ale suprafeței particulelor au fost sugerate ca factori care ar putea să determine distribuția lor în organism [4]. Nu există încă date exacte în acest sens, dar este posibil ca în anumite condiții patologice, factori plasmatici care apar în decursul bolii să ducă la agregări de particule prin modificări ale sarcinilor electrice sau să le modifice pregătirea pentru a fi fagocitate în funcție de structura suprafeței lor. În acest sens trebuie menționat rolul opsoninelor serice, anticorpi naturali care pregătesc particule străine din ser pentru a fi fagocitate; lipsa lor duce la o reducere considerabilă a capacității fagocitare.

Aproape toate PRF de coloizi radioactivi folosesc un stabilizator menit să mențină cît mai multă vreme coloidul în soluție. Stabilizatorii cel mai frecvent folosiți sînt gelatina sau substanțe macromoleculare de tip polivinil-pirolidon (PVP); studii ale cineticii de epurare a diferiților coloizi radioactivi au considerat stabilizatorul ca elementul care determină caracteristica de bază a coloidului acesta fiind îmbrăcat de un strat de molecule de stabilizator [6].

Toate cele discutate mai sus în legătură cu fagocitarea particulelor coloidale se bazează pe ipoteze, pe evidențe indirecte sau pe date experimentale și clinice incomplete. Rămîn ca fapte necontestabile că este imposibil să se fabrice un coloid după dorință, că dacă ar fi posibil nu am ști exact ce proprietăți (dimensiuni, sarcină, suprafață, stabilizator) să-i dăm și că trebuie să ne mulțumim cu rezultatele unor cercetări empirice care anunță relativ frecvent noi metode de preparare sau modificări ale metodelor vechi: rezultatele sînt greu de evaluat. De aceea se mai constată variații de comportament, de la șarjă la șarjă, al unui produs fabricat industrial ca aurul coloidal, fără să vorbim de diferențele de comportament ale coloizilor de ^{99m}Tc și ^{113m}In preparați extemporaneu. Rămîne, de asemenea, neexplicat comportamentul diferit al coloidului de la pacient la pacient în cadrul aceleiași șarje, fără ca aceste diferențe (creșterea captării splenice, medulare sau pulmonare) să aibă vreun suport obiectiv în termenii actuali ai aprecierii condițiilor patologice ale bolnavului. Cu toate acestea coloizii radioactivi rămîn unul din preparatele cele mai frecvent utilizate în investigația izotopică. De aceea, ne vom ocupa pe scurt de preparatele cel mai adesea folosite.

7.1.1. AURUL COLOIDAL RADIOACTIV (^{198}Au)

Preparatul folosit în mod curent constă dintr-o suspensie de particule coloidale cu dimensiunea medie de 40 mμ stabilizată cu gelatină.

După injectarea intravenoasă epurarea sanguină la subiectul normal se face monoexponențial cu un $T_{1/2}$-ef. în jur de 3 minute; o cantitate foarte mică (mai puțin de 0,1%) rămîne în sîngele circulant legat probabil de macrofagele plasmatice. În cazul afecțiunilor hepatice care scad potențialul de captare a celulelor Kuppffer epurarea este mult încetinită, $T_{1/2}$ ajungînd uneori pînă la 15 minute; curba de eliminare ia un aspect multiexponențial. Distribuția aurului coloidal epurat din sînge se modifică și ea în cazul unor afecțiuni hepatice. Tabela 7.1 redă aceste distribuții în funcție de afectarea ficatului [7].

Scanned with OKEN Scanner

Din tabelă se poate deduce că la subiecţii normali nu apare pe imaginea scintigrafică decît ficatul, în timp ce leziuni hepatice chiar uşoare pot duce, în unele cazuri, la conturarea splinei pe scintigramă. Imaginea măduvei osoase apare numai în cazuri de leziuni hepatice difuze foarte severe. Trebuie menţionat că deşi fabricat industrial prin proceduri

TABELA 7.1

Distribuţia tisulară a ^{198}Au din aur coloidal

Starea ficatului	Procent pe organ din ^{198}Au injectat			
	ficat	splină	măduvă hemato-poetică	alte organe
Normal	90	3	7	0
Leziuni hepatice difuze, uşoare pînă la moderate	70	13	12	5
Leziuni hepatice difuze, moderate pînă la severe	35	30	25	10

standardizate, distribuţia ^{198}Au coloidal la acelaşi individ nu este perfect reproductibilă, ea suferind uneori variaţii însemnate de la şarjă la şarjă; aceste variaţii pot apărea chiar şi cu aceeaşi şarjă dacă pacientul este examinat la intervale de timp diferite de la data preparării sau dacă între timp preparatul a fost supus unor manevre cum ar fi deplasări (transport dintr-o localitate într-alta, diluţii etc.); nu se cunoaşte exact cauza acestor variaţii. Fenomenele sus-menţionate nu influenţează în mod obişnuit decît în mică măsură imaginea scintigrafică, dar pot schimba mult valorile clearance-ului hepatic. Ţesuturile străine (tumorale) care pot apărea în ficat nu captează coloizi radioactivi: în cazul în care ţesutul străin constituie o masă suficient de mare, el este detectat sub forma unei zone reci, inactive. Zone hiperactive nu apar în mod obişnuit la examenul scintigrafic de rutină al ficatului ci se văd la nivelul ganglionilor limfatici după injectare subcutanată de aur coloidal (limfografie radioizotopică). Metoda se foloseşte pentru punerea în evidenţă a ganglionilor limfatici ai membrului inferior după injectarea de aur coloidal în spaţiul I interdigital al piciorului.

Efectele nocive ale aurului coloidal ar putea fi datorite fie toxicităţii preparatelor, fie iradierii. Cantitatea de aur este prea mică pentru a provoca efecte toxice; se descriu în schimb, rar, reacţii alergice de tip frison şi uneori erupţii cutanate care apar la 2—3 ore după injectarea preparatului; se pare că nu aurul ci substanţele stabilizatoare, gelatina, ar putea fi cauza acestor reacţii.

Iradierea întregului organism ca şi a unor organe mai sensibile sau mai expuse este redată în tabela 7.2 [7].

Se pot vedea diferenţele datorită afectării ficatului. Se constată că injectînd 250—300 μCi cît se administrează pentru un examen scintigrafic obişnuit doza pentru ficatul normal este de 10—13 rad, iar pentru o splină cirotică doza este de 14—17 rad. Dacă dozele pentru un singur examen sînt în limite obişnuite, fiind similare cu cele primite în cursul unor examene radiografice uzuale, repetarea de mai multe ori a examenului cu ^{198}Au coloidal duce la absorbirea unor doze de radiaţii relativ mari fără ca totuşi să se fi semnalat pînă acum vreo manifestare patologică datorată în mod neechivoc iradierii cu aur coloidal administrat în scop diagnostic.

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie aurul coloidal radioactiv este un coloid suficient de stabil avînd cost redus, cu posibilitatea de a fi transportat la distanţă, deci îndeplinind criteriile economico-organizatorice ale PRF, dar care supune organismul la o doză relativ mare de iradiere. Măsura în care s-au putut găsi alţi coloizi care să-i imite pe cît posibil calităţile iradiind însă mai puţin organismul a dus la înlocuirea lui încă incompletă.

TABELA 7.2

Dozele absorbite pe mCi ^{198}Au în funcţie de starea ficatului după o injecţie intravenoasă unică de ^{198}Au coloidal (rad/mCi)

Ţesut	Ficat normal	Leziuni hepatice difuze, uşoare pînă la moderate	Leziuni hepatice difuze, moderate pînă la severe
Ficat	39	24	19
Ovare	0,14	0,27	0,47
Măduvă osoasă	2,7	4,5	8,9
Splină	12	38	56
Testicule	0,035	0,11	0,19
Tot corpul	1,4	1,4	1,4

7.1.2. COLOIZI MARCAŢI CU ^{99m}TECHNEŢIU

Sînt în momentul de faţă coloizii cei mai frecvent folosiţi în scintigrafia hepatică. Această răspîndire nu ţine atît de calităţile coloizilor în sine cît de posibilităţile multiple de utilizare ale ^{99m}Tc precum şi de calităţile lui izotopice pentru scintigrafie. Primii coloizi propuşi au fost combinaţii ale ^{99m}Tc sub formă de sulfuri coloidale preparate instantaneu în laborator.

Actualmente se propune un nou preparat coloidal cu fitat de ^{99m}Tc a cărui preparare este posibilă fără încălzire, din soluţii sterile dinainte

TABELA 7.3

Distribuţia tisulară a ^{99m}Tc din Tc-sulfocoloid sau fitat

Starea ficatului	Pe organ procent din ^{99m}Tc injectat			
	ficat	splină	măduvă hemato-poetică	alte organe
Normal	25	7	5	—
Leziuni hepatice difuze, uşoare pînă la moderate	67	13	12	—
Leziuni hepatice difuze, moderate pînă la severe	32	30	25	—

pregătite, calităţile coloidului obţinut fiind practic identice cu cele ale sulfurii coloidale [8]. De remarcat că fitatul poate fi injectat ca atare, coloidul formîndu-se în plasmă în contact cu ionul de calciu circulant sau poate fi preparat *in vitro* prin adăugarea de calciu preparatului înainte de injectare [9]. Distribuţia coloidului de ^{99m}Tc este redată în tabela 7.3,

Scanned with OKEN Scanner

ea fiind socotită identică pentru sulfo-coloid şi pentru fitat [10]. Se poate constata că distribuţia este similară cu cea a ^{198}Au coloidal, în special în cazurile patologice ; la subiecţii normali procentul mai mare de ^{99m}Tc-coloid captat în splină permite de obicei vizualizarea acestui organ pe imaginea scintigrafică, ceea ce nu se întîmplă atunci cînd se foloseşte aur coloidal.

Prepararea în laborator a coloidului pune unele probleme legate de posibile reacţii adverse : s-au descris în literatură cîteva cazuri cu reacţii alergice grave după administrarea coloidului, dintre care unele mortale. Se presupune că aceste reacţii au fost datorate substanţei stabilizatoare care, în cele mai multe cazuri, era gelatina.

Posibilitatea unor asemenea accidente impune existenţa în laborator a unei truse de terapie de urgenţă a şocului anafilactic. Preparatul mai trebuie, de asemenea, testat pentru prezenţa ^{99m}Tc liber ; în cazul unui procent ridicat de radioizotop neinclus în coloid, acumularea acestuia la nivelul stomacului poate da artefacte care duc la erori de interpretare.

Doza de iradiere este considerabil mai mică decît în cazul aurului datorită atît $T_{1/2}$-fizic scurt cît şi lipsei de radiaţii β. Iradierea diferitelor organe este prezentată în tabela 7.4 [10]. Se poate constata că pentru

TABELA 7.4

Dozele absorbite în funcţie de starea ficatului după o injecţie i.v. unică de ^{99m}Tc-coloid (rad/mCi)

Ţesut	Ficat normal	Leziuni hepatice difuze, uşoare pînă la moderate	Leziuni hepatice difuze, moderate pînă la severe
Ficat	0,34	0,21	0,16
Splină	0,21	0,28	0,42
Ovare	0,0056	0,0081	0,012
Testicule	0,0011	0,0021	0,0032
Măduvă osoasă	0,027	0,045	0,079

doza uzuală de 1—2m Ci ^{99m}Tc-coloid iradierea este cam de 10 ori mai mică decît pentru ^{198}Au coloidal, ceea ce permite repetarea cu frecvenţă mai mare a scintigramelor hepatice şi stabileşte ca indicaţie absolută, folosirea izotopilor cu viaţă scurtă pentru scintigrafiile hepatice la copii.

7.1.3. COLOIZI MARCAŢI CU ^{113m}INDIU

Se folosesc atunci cînd nu există condiţiile unei aprovizionări continue şi ritmice cu ^{99m}Tc. Prepararea coloidului radioactiv cu ^{113m}In este în general mai comodă decît a ^{99m}Tc-sulfocoloidului ; mai prezintă avantajul că poate fi folosit fără stabilizator, ceea ce reduce aproape complet pericolul accidentelor alergice. Distribuţia coloidului este 90% în ficat, 2% în splină şi 4% în măduva osoasă [10], dozele de iradiere în rad/mCi fiind, în aceste condiţii, 0,48 pentru ficat, 0,0025 pentru ovare, 0,0011 pentru testicule şi 0,020 pentru măduva osoasă. Se pare totuşi că acumularea în splină este mai mare decît cea indicată mai sus, fiind tot în jur de 7—10% ca şi în cazul ^{99m}Tc coloidal. Iradierea este în orice caz similară cu cea a techneţiului, activităţile administrate fiind tot în jur

Scanned with OKEN Scanner

de 1—2 mCi. Dezavantajul ^{113m}In față de ^{99m}Tc constă în $T_{1/2}$ fizic foarte scurt (90 minute) care nu permite păstrarea coloidului decît maximum 1—2 ore după preparare. Radiațiile gamma de ^{113m}In (393 keV) sînt comparabile cu ale ^{198}Au ceea ce impune folosirea unor colimatoare cu eficiență mai mică decît cele pentru ^{99m}Tc și duce la prelungirea duratei examenului scintigrafic.

În privința coloizilor marcați cu izotopi cu viață scurtă mai trebuie spus că prepararea în laborator se însoțește uneori de nereușita preparării în care caz coloidul este acumulat aproape total în plămîn sau rămîne în circulația generală. Cauzele acestor nereușite nu sînt bine cunoscute; ele apar întîmplător, sporadic chiar și în condițiile folosirii acelorași reactivi prepararea fiind efectuată de aceeași persoană. Cu toate dezagrementele legate de prepararea în laborator, acești coloizi constituie azi preparatele de bază pentru scintigrama hepatică. Lipsa de siguranță asupra constanței proprietăților lor fizico-chimice nu permite folosirea lor la măsurarea clearance-ului hepatic dar posibilitatea injectării în doze mari (10—15 mCi) fără pericol mare de iradiere face posibilă investigarea circulației hepatice prin imagini secvențiale rapide obținute pînă la 30 secunde după injectare [11]. Informațiile diagnostice obținute sînt comparabile cu cele ale clearance-ului hepatic, ele permițînd într-o măsură similară diagnosticarea afecțiunilor hepatice difuze.

7.2. RADIOFARMACEUTICE EXCRETATE PRIN BILĂ, FOLOSITE PENTRU SCINTIGRAFIA HEPATICĂ ȘI A CĂILOR BILIARE

Primul compus de acest tip, ^{131}I-roz bengal, a apărut puțin înaintea coloizilor radioactivi fiind folosit inițial pentru scintigrafia hepatică. Față de radiocoloizi prezenta însă dezavantajul major al unei cinetici evidente în timpul examinării, în special în condițiile folosirii scintigrafului liniar: radiotrasorul era acumulat în colecist și excretat în intestin chiar în cursul examinării ceea ce ducea la imagini distorsionate. De aceea, ^{131}I-roz bengalul nu a mai fost folosit pentru scintigrafia hepatică fiind utilizat sporadic ca PRF de investigare a funcției hepatice (clearance-ul cu roz bengal) sau de determinare a permeabilității căilor biliare în special la copii. Apariția unor scintigrafe cu sensibilitate mare permițînd obținerea unor imagini în timp scurt și apoi a camerei de scintilație a adus din nou în actualitate acest tip de PRF, în scopul explorării căilor biliare; în același timp s-a reactivat interesul pentru utilizarea lor în investigația funcțională a ficatului. Pe lîngă ^{131}I-roz bengal au apărut și alți compuși folosind ^{123}I pentru roz bengal sau modificînd PRF: se folosesc azi ^{131}I BSP și compuși marcați cu ^{99m}Tc.

Farmacocinetica tuturor acestor compuși este similară, ei fiind din punct de vedere chimic coloranți sau substanțe înrudite cu coloranții. Metabolismul lor este asemănător cu pigmentul găsit în mod normal în organism și excretat în totalitate prin ficat: bilirubina. După injectarea i.v. a unui astfel de compus el se leagă de o proteină circulantă care îl vehiculează în plasmă, este captat de celulele hepatice, trecut de la polul sanguin la polul biliar al celulei hepatice cu ajutorul unui mecanism transportor, conjugat eventual pe parcurs (glicurono- sau sulfoconjugare) și excretat în canalele biliare [12]. Trecerea din sînge în ficat are un mecanism mai

Scanned with OKEN Scanner

complicat şi incomplet lămurit pînă în prezent. Epurarea sanguină a acestor compuşi este mult mai lentă decît cea a coloizilor radioactivi (0,10 din volumul de distribuţie pe minut faţă de 0,20 — 0,25), extracţia adică ceea ce este reţinut la prima trecere prin ficat, fiind mai mică de 50% Motivul pentru care o parte din PRF trece prin ficat fără să fie reţinut ţine pe de o parte de dificultatea de a traversa capilarul spre spaţiile Disse dar mai ales de un transfer în dublu sens adică şi din plasmă, direcţia fluxului net fiind stabilită de gradientul de concentraţie. Traversarea celulei hepatice, conjugarea şi excreţia biliară depind de integritatea funcţională a celulei hepatice, iar excreţia mai este legată şi de fluxul din sistemul canalelor biliare. S-ar părea deci că există premise teoretice de folosire a acestor substanţe pentru investigaţia funcţională a ficatului cu atît mai mult cu cît clearance-ul lor este similar cu cel al BSP neradioactiv, compus major în testarea ficatului. În realitate s-a constatat că sensibilitatea testelor radiofarmaceutice este mult mai mică decît a celor care folosesc BSP neradioactiv [13]. În privinţa folosirii acestor PRF pentru investigaţia căilor biliare şi a colecistului ele se dovedesc de reală utilitate în stabilirea naturii unui icter (mecanic sau hepato-celular) şi uneori în explorarea colecistului, lipsa pătrunderii PRF în vezicula biliară fiind un argument puternic în favoarea existenţei unei obstrucţii a canalului cistic. Detecţi a calculilor a fost încercată şi deşi este eventual posibilă pentru calculi foar te mari nu poate fi recomandată ca o metodă de uz curent, rezoluţia sistemelor scintigrafice actuale nepermiţînd detectarea calculilor mijlocii şi mici. Posibilităţile de a efectua scintigrafii secvenţiale cu camera de scintilaţie permit obţinerea de informaţii interesante în special privind dinamica căii biliare principale.

7.2.1. RADIOIOD - ROZ BENGALUL

Este un colorant halogenat fluorescent marcat cu ^{131}I sau cu alţi izotopi ai iodului, dintre care cel mai interesant este ^{123}I. Pentru a putea fi utilizat trebuie să conţină cît mai puţin radioiod liber. Dată fiind cinetica acestui tip de substanţe descrisă mai sus, acumularea în diferite organe variază rapid în timp. Constantele de epurare pentru organele prin care trece PRF sînt 0,10 — 0,075 pe minut pentru sînge, 0,462 pe oră pentru ficat şi colecist, 0,250 pe oră pentru intestinul subţire, 0,0769 pe oră pentru jumătatea superioară a colonului şi 0,0417 pentru colonul inferior [14]. În cazuri de leziuni grave o cantitate considerabilă de PRF este acumulat în rinichi şi excretat prin urină. Se poate constata că stagnarea mare a PRF are loc în intestin, de unde o iradiere mai mare a organelor genitale. Dozele calculate în rad/mCi ^{131}I sînt 0,80 pentru ficat, 0,32 pentru măduva hematopoetică, 1,6 pentru ovare, 0,14 pentru testicule, 1,1 pentru colecist, 3,5 pentru intestinul subţire, 14 pentru colonul proximal şi 35 pentru colonul distal. Calculele sînt valabile pentru subiecţii cu ficat normal şi cu tiroida blocată [14]. Folosind ^{123}I dozele se reduc la un sfert (ficat 0,19 în loc de 0,88 etc.). În cantităţile folosite în mod uzual toxicitatea radioroz bengalului este nulă , iar reacţiile alergice sînt practic absente. Produsul marcat cu ^{131}I administrat i.v. în doze uzuale de 250—300 μCi prezintă dezavantajul unei iradieri relativ mari şi avantajul de a-i putea urmări comportarea în organism timp de 2—3 zile după administrare, timp necesar uneori în urmărirea apariţiei intestinale la bolnavii icterici.

Scanned with OKEN Scanner

7.2.2. RADIOBROMSULFALEINA (BSP)

Marcat cu radioiod, este compusul folosit în mod curent pentru testarea funcţiei excretorii hepatice. Se comportă similar cu radio-roz bengalul prezentînd avantajul că i se poate adăuga cantitatea necesară de BSP neradioactiv în cazul în care vrem să testăm funcţia hepatică [15].

7.2.3. COMPUŞI HEPATO-BILIARI MARCAŢI CU ^{99m}Tc

Încercări de a obţine compuşi marcaţi cu izotopi de viaţă fizică scurtă pentru scintigrafia hepato-biliară au început la cîţiva ani după apariţia ^{99m}Tc în scintigrafie. Compuşii chimici la care s-au oprit actualmente cercetările sînt complecşi de piridoxal (glutamat, leucină, arginină), acidul mercaptoizobutiric şi în special acidul 2,6-dimetilacetanilidiminoacetic (HIDA) sau diverşi derivaţi ai acestuia (substituirea celor 2 metili din poz. 2,6 cu grupări etil, introducerea unei grupări sau a unui atom de iod în poziţia *para* etc.) [16]. Studii experimentale au arătat că în comparaţie cu radio-roz bengalul epurarea sanguină, acumularea hepatică şi concentraţia biliară sînt similare sau chiar superioare pentru derivaţii acidului iminoacetic [17]. Se deschid astfel perspective de obţinere a unor imagini scintigrafice bune ale colecistului şi ale căilor biliare, dar mai ales posibilitatea ca urmărind dinamica acestor compuşi să obţinem informaţii extrem de preţioase asupra funcţionalităţii căilor biliare [18]. Trebuie subliniat, în concluzie, că folosirea PRF pentru scintigrafia hepato-biliară este limitată şi totdeauna inferioară examenului radiologic cu substanţe de contrast iodate. Avîntul acestor examinări apărut odată cu perfecţionarea camerelor de scintilaţie şi a sistemelor de prelucrare numerică a datelor este justificat datorită numărului tot mai mare de cazuri în care examenul radiologic nu poate fi efectuat din cauza intoleranţei la compuşii iodaţi. În aceste cazuri, ca şi în ictere, informaţiile chiar incomplete oferite de scintigrafia hepato-biliară reprezintă adesea un ajutor preţios pentru diagnostic.

7.3. RADIOFARMACEUTICE FOLOSITE ÎN SCINTIGRAFIA PANCREASULUI

Explorarea morfologică şi funcţională a pancreasului pune probleme extrem de dificile datorită volumului redus al glandei şi poziţiei ei. Încă din prima perioadă a medicinei moderne s-au căutat substanţe cu tropism pancreatic specific; s-a recurs la aviditatea mare a pancreasului pentru aminoacizi, necesari fabricării enzimelor digestive. Aminoacidul ales a fost metionina la care, pentru convenienţe scintigrafice, s-a înlocuit atomul de sulf (β-emiţător pur) cu un atom de ^{75}seleniu, γ-emiţător, avînd una din radiaţii cu o energie bună pentru scintigrafie (270 keV). Pancreasul este mai puţin avid de metionină decît de alţi aminoacizi ceea ce a dus la încercări de a marca alţi aminoacizi, alanina în mod special cu ^{18}fluor; pe lîngă dificultăţile tehnice (^{18}fluor este produs de ciclotron cu viaţă fizică scurtă) s-a constatat că rezultatele nu depăşesc pe cele obţinute cu ^{75}Se-selenometionină. Dezavantajul aminoacizilor este distribuţia lor

în toate organele, unul din organele cele mai avide de aminoacizi fiind ficatul, situat în imediata vecinătate a pancreasului; se obţin astfel concomitent imagini ale ambelor organe, pancreasul fiind greu de delimitat în cazurile în care ficatul, îl acoperă; separarea se poate face efectuînd o a doua scintigramă cu un coloid radioactiv şi făcînd electronic substracţia imaginii hepatice din scintigrama cu radioselenometionină. Cu toate criticile ce i se aduc, scintigrama pancreatică cu ^{75}Se-metionină rămîne o metodă în uz poate nu atît pentru precizia rezultatelor cît pentru că este una din puţinele metode neinvazive pe care le avem la dispoziţie în explorarea pancreasului [19].

Cinetica ^{75}Se-metioninei este practic identică cu cea a omologului ei fiziologic metionina; după injectare se distribuie în pool-ul aminoacizilor de unde se împarte la diferitele organe în funcţie de activitatea lor metabolică şi de volumul lor. O estimare a distribuţiei pe organe [10] şi a timpilor de înjumătăţire pentru fiecare organ arată că în pancreas se acumulează 0,69% din doză cu timpul de înjumătăţire principal 13,2 ore, iar în ficat se acumulează 24% cu timpii de înjumătăţire de 33,1 zile (58%) şi 13,2 ore (38%). Cantităţi ceva mai mari se mai acumulează în plămîni (3,6%), splină (1,5%) şi rinichi (3,8%) cu timpi de înjumătăţire principali de 33,1 zile. Aproape 70% din cantitatea injectată circulă distribuită în tot organismul, amestecată cu aminoacizii circulanţi sau tisulari.

$T^1/_2$ fizic lung (127 zile) şi posibilităţile reduse de eliminare sînt cauzele principale ale iradierii relativ mari după administrarea de ^{75}Se-metionină. În rad/mCi, dozele absorbite sînt 25 pentru ficat, 14 pentru pancreas, 9,9 pentru ovare, 8,6 pentru testicule şi 9,7 pentru măduva hematopoetică [10]. Considerînd că în mod curent se administrează 250 μCi pentru un examen scintigrafic, dozele obţinute pe examen sînt un sfert din cele enumerate mai sus, ceea ce limitează în mod serios repetarea examenului şi chiar efectuarea lui la tineri şi copii.

Toxicitatea produsului este nulă. Măsurile ajutătoare pentru a creşte fixarea pancreatică şi de a reduce pe cea hepatică sînt fără efect unanim recunoscut, fiecare serviciu avînd un protocol propriu care, empiric, pare să dea cele mai bune rezultate.

7.4. RADIOFARMACEUTICE FOLOSITE ÎN INVESTIGAREA INTESTINULUI SUBŢIRE

Se cercetează capacitatea funcţională de absorbţie a intestinului subţire pentru grăsimi şi vit. B_{12}, contaminarea bacteriană intestinală prin măsurarea deconjugării acizilor biliari marcaţi cu ^{14}C şi exudarea proteică intestinală cu albumină marcată cu ^{51}Cr.

7.4.1. GRĂSIMILE MARCATE

Se folosesc, din ce în ce mai puţin, trioleina şi acidul oleic marcaţi cu ^{131}I. Motivul părăsirii treptate a acestor PRF este labilitatea compusului o cantitate însemnată de ^{131}I fiind eliberată după administrarea peroralã. În aceste condiţii nu se mai ştie dacă radioactivitatea măsurată provine din grăsimile marcate sau din iod liber.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă se adaugă iradierea relativ mare, comparabilă cu cea după roz bengal, respectiv 20 rad/mCi pentru tubul digestiv, se pare că riscul nu merită rezultatele imprecise care se obţin, cu atît mai mult cu cît există metode neizotopice mai dificile din punct de vedere tehnic dar mult mai precise.

Se încearcă folosirea grăsimilor marcate cu ^{14}C măsurînd $^{14}CO_2$ din aerul expirat la diferite intervale după administrarea peroralã de grăsimi marcate (radiorespirometrie). Dozele administrate sînt de 5 μCi, iar iradierea pare neglijabilă [20]. Se consideră că administrarea de 10 μCi a unui produs marcat cu ^{14}C unui om de 70 kg dă o iradiere integrată pe 400 de zile de 15 mrad în comparaţie cu 1200 mrad iradierea datorită fondului natural. Deşi testul nu este încă omologat, rezultatele sînt satisfăcătoare [20], iar uşurinţa tehnică cu care se execută par să-l recomande ca o metodă cu viitor. În aceeaşi categorie se află acizii biliari marcaţi cu ^{14}C. Sînt folosiţi pentru determinarea contaminării bacteriene a intestinului subţire : o populaţie bacteriană anormală duce la deconjugarea acizilor biliari cu eliberarea de $^{14}CO_2$ care este eliminat prin aerul expirat.

7.4.2. VITAMINA B_{12} MARCATĂ CU ^{57}Co SAU ^{58}Co

Se utilizează la determinarea absorbţiei intestinale dar şi la stabilirea existenţei factorului intrinsec secretat în stomac fără care absorbţia nu poate avea loc. Măsurarea cantităţii absorbite se face fie măsurînd activitatea excretată timp de 24 ore în urină (testul Schilling) fie măsurînd activitatea întregului corp cu un contor special, imediat după administrare şi apoi după 10 zile (metodă posibilă numai cu ^{58}Co).

Vit. B_{12} se distribuie în tot organismul, ficatul fiind organul care acumulează o cantitate mai mare. Întrucît se administrează 0,5 μCi iradierea este foarte redusă : pentru 1 μCi măduva hematopoetică absoarbe 2 mrad pentru $^{57}Co_2$ şi 3,6 mrad pentru ^{58}Co [10].

7.4.3. SERUMALBUMINA MARCATĂ CU ^{51}Cr

Se administrează i.v. şi se măsoară radioactivitatea fecalelor timp de 3 zile. O creştere a radioactivităţii fecale de peste 1% din doza administrată indică o exudare anormală de proteine în intestin. Radiocromalbumina injectată persistă multă vreme în plasmă, cromul fiind acumulat apoi în SRE. Dozele de iradiere sînt reduse : dacă extrapolăm de la hematiile marcate cu ^{51}Cr iradierea întregului corp este 0,37 rad/mCi [10].

În investigarea aparatului digestiv se mai folosesc PRF inerte din punct de vedere digestiv pentru urmărirea golirii gastrice. Produsele folosite sînt fie coloizi radioactivi, fie chelaţi tip DTPA marcaţi cu izotopi de viaţă scurtă. În tubul digestiv aceste PRF se comportă inert, nefiind nici absorbite şi neintrînd în combinaţii cu substanţele din stomac sau intestin.

BIBLIOGRAFIE

1. C.W. Sheppard, G. Jordan, P.P. Hahn, *Amer. J. Physiol.*, **164**, 345 (1951).
2. E.L. Dobson, H.B. Jones, *Acta Med. Scand.*, **144**, Supl. 273 (1952).
3. L.A. Stirrett, E.T. Yuhl, B. Cassen, *Amer. J. Gastroent*, **21**, 310 (1954).
4. W.B. Nelp, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med., Inc., New York, 1975, p. 349.
5. A.L.W.F. Eddelston, L.M. Blendis și colab., *GUT*, **10**, 711 (1969).
6. A. Desgrez, J. Chambron și colab., în „Dynamic Studies with Radioisotopes", IAEA, 1970.
7. Mird, Dose estimate report No. 4, *J. Nucl. Med.*, **16**, 173 (1975).
8. G. Zita, H. Viberrak și colab., în „Dynamic Studies with Radioisotopes in Medicine", IAEA, 1975, vol. 1, p. 125.
9. A. Arzoumanian, L. Rosenthall, H. Seto, *J. Nucl. Med.*, **18**, 118 (1977).
10. A. Kaul, H.D. Roedler, G.J. Hine, în „Medical Radionuclide Imaging", IAEA, 1977, vol. 2, p. 423.
11. M.L. Sunderland, V.A. Brookeman, *J. Nucl. Med.*, **14**, 230 (1973).
12. R.A. Nordyke, în „Radionuclide Studies of the Gastrointestinal System", Grune & Stratton, New York — London, 1972, p. 71.
13. Gh. Jovin, „Teză doctorat", I.M.F., București, 1974.
14. Mird, Dose estimate report No. 7, *J. Nucl. Med.*, **16**, 1214 (1975).
15. A. Mostbeck, L. Peschl, *Nuccompact* **3**, 40 (1972).
16. M.D. Loberg, M. Cooper și colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 633 (1976).
17. R.W., Wistow, G. Subramanian și colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 455 (1977).
18. P.M. Ronai, *J. Nucl. Med.*, **18**, 488 (1977).
19. T. Spîrchez, B. Ghergheescu, Gh. Jovin, D. Pavel, „Scintigrafia clinică", Edit. medicală, București, 1968.
20. A. Newman, *GUT*, **15**, 308 (1974).

Capitolul 8

PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN EXPLORAREA HEMATOLOGICĂ

Domeniu tradiţional al medicinii nucleare, hematologia utilizează o gamă largă de PRF care pot fi clasificate în :

— PRF destinate explorării volumului plasmatic,
— PRF pentru marcarea elementelor figurate sanguine,
— PRF destinate explorării metabolismului fierului (ferocinetică),
— PRF utilizate în vizualizarea splenică şi a măduvei osoase.

8.1. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE DESTINATE EXPLORĂRII VOLUMULUI PLASMATIC

Volumul plasmatic total este explorabil cu trasori care îndeplinesc următoarele condiţii : mixică rapidă şi omogenă în întregul compartiment intravascular, absenţa metabolizării sau a extravazării imediate, lipsa unor efecte perturbatoare — acute sau cronice — în sistemul investigat [1].

PRF consacrat determinărilor de volum plasmatic este radioiod-serumalbumina umană (RISA) marcată cu ^{131}iod sau, mai ales, cu ^{125}iod. După injectarea intravenoasă, la subiecţii normali, mixica intravasculară a RISA se desăvîrşeşte într-un interval de 5—6 minute ; la bolnavii cu edeme sau stază în diferite teritorii circulatorii echilibrul de amestec al RISA se atinge cu întîrziere. Atît în timpul mixicei cît şi în continuarea acesteia are loc concomitent şi un transfer interstiţial lent al RISA ; se apreciază că acest proces este caracterizat, în medie, printr-un $T_{1/2}$ biologic de 269 ± 149 min [2]. RISA injectată intravenos se echilibrează astfel, în mod lent, cu întregul fond metabolic de schimb proteic extracelular, care în proporţie de 60 % este extravascular [3]. Ţinînd seama de existenţa procesului de transfer extravascular, determinarea corectă a volumului plasmatic se efectuează prelevînd probe la 10, 20 şi 30 min de la injectare şi determinînd volumul de distribuţie al RISA la timpul zero prin retro-extrapolare. Pe plan radionuclidic ^{125}I este preferat ^{131}I pentru marcarea RISA avînd în vedere următoarele argumente : stabilitatea mai bună a ^{125}I-RISA, posibilităţi superioare de radiometrie spectrometrică gamma în cazul investigaţiilor multitrasor, stocare mai îndelungată, doză de iradiere a organismului mai scăzută.

Scanned with OKEN Scanner

8.2. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE PENTRU MARCAREA ELEMENTELOR FIGURATE SANGUINE

De cea mai largă utilizare practică sînt tehnicile de marcare a eritrocitelor folosind ca PRF cromatul de sodiu ($^{51}CrO_4^{--}$), pertechnetatul ($^{99m}TcO_4^-$) sau diizopropilfluorofosfatul ($DF^{32}P$).

8.2.1. MARCAREA ERITROCITELOR CU ^{51}Cr

Marcarea *in vitro* cu ^{51}Cr rămîne tehnica cea mai larg utilizată pentru determinările de volum eritrocitar circulant ca și a duratei de viață a hematiilor. Se indică $^{51}CrO_4Na_2$ ca PRF întrucît numai ^{51}Cr hexavalent poate pătrunde prin membrana eritrocitară intactă; ajuns în interiorul hematiei se pare că ^{51}Cr anionic (hexavalent) este redus la ^{51}Cr cationic (trivalent). Pătruns în eritrocit ^{51}Cr se leagă aproape exclusiv la catena β a moleculei de globină din structura hemoglobinei [4].

În procesul de marcare un rol esențial joacă cantitatea de cromat ce intră în reacție; concentrații de ordinul 5μg cromat/ml eritrocite produc inhibiții enzimatice, iar concentrații mai mari de 10 μg/ml inhibă glicoliza eritrocitară [4]. De aceea se impune folosirea unor activități specifice de 100—300 μCi/μgCr cu care se realizează marcarea eritrocitelor fără producerea de efecte toxice pe metabolismul celular. Legarea $^{51}CrO_4^{--}$ de eritrocite *in vitro* este relativ rapidă (în primele 20 minute de incubare la 37° peste 90% din activitate se leagă de hematii) și omogenă. În ceea ce privește stabilitatea legăturii se descrie fenomenul de „eluție" a ^{51}Cr de pe eritrocitele marcate. Într-adevăr ^{51}Cr-eritrocitele reinjectate pierd din radioactivitate prin două tipuri de procese: „eluția rapidă" prezentă în primele 24—48 de ore ce pare a obiectiviza dispariția trasorului defectuos legat de hematii și „eluția lentă" survenind în zilele următoare, caracterizată printr-un proces exponențial simplu, ce interesează 0,6—2,2%/24 ore din cantitatea de ^{51}Cr [5]. Ambele tipuri de eluție par a prezenta variații interindividuale ce nu depind numai de tehnica folosită pentru marcarea eritrocitelor [6, 7].

Un artificiu tehnic care extinde sfera de utilizare a ^{51}Cr-eritrocitelor este denaturarea acestora prin agenți fizici sau chimici; eritrocitele astfel fragilizate sînt reținute intrasplenic, servind la explorarea funcțională și morfologică a respectivului organ [8].

8.2.2. MARCAREA ERITROCITELOR CU ^{99m}Tc

Caracteristicile radionuclidice ale ^{99m}Tc îl recomandă pentru marcarea hematiilor utilizabile la determinări de volemie sau la vizualizări de spații vasculare. S-au descris două modalități tehnice de marcare, inițial *in vitro*, iar mai recent *in vivo*.

Marcarea *in vitro* se poate efectua fără agent reducător [9], obținîndu-se însă randamente scăzute și variabile [10]; prin folosirea de agenți reducători, în special a Sn^{++}, randamentele de marcare ajung la 85—97%, iar legătura dintre ^{99m}Tc și eritrocit este destul de stabilă pe intervalul primei ore de la reinjectare [10, 11].

Scanned with OKEN Scanner

Marcarea *in vivo* este realizabilă prin administrarea inițială a unui preparat conținînd ionul Sn^{++} urmată apoi de injectarea $^{99m}TcO_4^-$ care, în aceste condiții, se leagă de eritrocitele circulante [12]. Randamentul maxim la marcare in vivo, apreciat la 80—90%, s-a obținut la doze de 10 μg Sn^{++}/kg corp urmate la 10—30 minute de administrarea radiopertechnetatului [13]. Marcarea *in vivo* a eritrocitelor cu ^{99m}Tc se dovedește avantajoasă pentru vizualizarea încăperilor cardiace, cu aprecierea cantitativă a funcției ventriculare stîngi [11].

8.2.3. MARCAREA ERITROCITELOR CU DIIZOPROPILFLUOROFOSFAT (DPF)

DPF marcat cu ^{32}P sau ^{3}H este folosit ca PRF de marcare a elementelor figurate sanguine datorită proprietății sale de a fi un puternic inhibitor al acetilcolinesterazei. Legîndu-se ireversibil de eritrocite, atît *in vivo* cît și *in vitro*, $D^{32}PF$ este unul din radiotrasorii recomandați pentru determinarea duratei de viață a hematiilor. Prin marcarea *in vivo*, tehnica preferată de rutină, eritrocitele fixează circa 35% din doza de $D^{32}PF$ administrată intravenos, procentul crescînd în cazul unor injectări lente [4]. Aproximativ 90% din PRF fixat eritrocitar este localizat intracelular, iar restul de 10% pe membrana hematiei. Fixarea ireversibilă de esteraze nu lezează hematiile și, ca urmare, printr-o marcare celulară omogenă, se obțin curbe ale duratei de viață eritrocitară caracterizate printr-o liniaritate foarte bună, cu absența fenomenului de eluție lentă [14]. Pe plan radiofarmaceutic se impută $D^{32}PF$ faptul că nu este specific hematiilor (marcînd și celelalte elemente figurate sanguine) precum și caracteristicile fizice ale ^{32}P, emițător β pur ce nu poate fi urmărit și prin detecție externă [15].

8.2.4. MARCAREA ALTOR ELEMENTE FIGURATE SANGUINE

Trombocitele pot fi marcate *in vitro* cu $^{51}CrO_4Na_2$ sau *in vivo* cu $D^{32}PF$, recurgîndu-se însă la tehnici de separare laborioase, ce depășesc cadrul activității curente a laboratoarelor de medicină nucleară. Granulocitele pot fi de asemenea marcate, pentru cercetări de cinetică, fie cu ^{51}Cr fie cu $D^{32}PF$, problematică ce prezintă însă o sferă de interes restrînsă.

În schimb se pare că marcarea granulocitelor cu ^{99m}Tc [16], ^{111}In [17] sau ^{67}Ga [18] pentru detecția și localizarea inflamațiilor acute chirurgicale ar reprezenta un domeniu cu perspective de dezvoltare mai largă pe plan diagnostic curent.

8.3. UTILIZAREA PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE ÎN EXPLORAREA METABOLISMULUI FIERULUI

8.3.1. ELEMENTE DE FEROCINETICĂ

Fierul se găsește în cantități relativ reduse în organism, dar este prezent la nivelul tuturor aparatelor și sistemelor anatomo-fiziologice, îndeplinind funcții esențiale în procesele vitale (tabela 8.1).

Scanned with OKEN Scanner

Marcarea *in vivo* este realizabilă prin administrarea inițială a unui preparat conținînd ionul Sn^{++} urmată apoi de injectarea $^{99m}TcO_4^-$ care, în aceste condiții, se leagă de eritrocitele circulante [12]. Randamentul maxim la marcare in vivo, apreciat la 80—90%, s-a obținut la doze de 10 μg Sn^{++}/kg corp urmate la 10—30 minute de administrarea radiopertechnetatului [13]. Marcarea *in vivo* a eritrocitelor cu ^{99m}Tc se dovedește avantajoasă pentru vizualizarea încăperilor cardiace, cu aprecierea cantitativă a funcției ventriculare stîngi [11].

8.2.3. MARCAREA ERITROCITELOR CU DIIZOPROPILFLUOROFOSFAT (DPF)

DPF marcat cu ^{32}P sau ^{3}H este folosit ca PRF de marcare a elementelor figurate sanguine datorită proprietății sale de a fi un puternic inhibitor al acetilcolinesterazei. Legîndu-se ireversibil de eritrocite, atît *in vivo* cît și *in vitro*, $D^{32}PF$ este unul din radiotrasorii recomandați pentru determinarea duratei de viață a hematiilor. Prin marcarea *in vivo*, tehnica preferată de rutină, eritrocitele fixează circa 35% din doza de $D^{32}PF$ administrată intravenos, procentul crescînd în cazul unor injectări lente [4]. Aproximativ 90% din PRF fixat eritrocitar este localizat intracelular, iar restul de 10% pe membrana hematiei. Fixarea ireversibilă de esteraze nu lezează hematiile și, ca urmare, printr-o marcare celulară omogenă, se obțin curbe ale duratei de viață eritrocitară caracterizate printr-o liniaritate foarte bună, cu absența fenomenului de eluție lentă [14]. Pe plan radiofarmaceutic se impută $D^{32}PF$ faptul că nu este specific hematiilor (marcînd și celelalte elemente figurate sanguine) precum și caracteristicile fizice ale ^{32}P, emițător β pur ce nu poate fi urmărit și prin detecție externă [15].

8.2.4. MARCAREA ALTOR ELEMENTE FIGURATE SANGUINE

Trombocitele pot fi marcate *in vitro* cu $^{51}CrO_4Na_2$ sau *in vivo* cu $D^{32}PF$, recurgîndu-se însă la tehnici de separare laborioase, ce depășesc cadrul activității curente a laboratoarelor de medicină nucleară. Granulocitele pot fi de asemenea marcate, pentru cercetări de cinetică, fie cu ^{51}Cr fie cu $D^{32}PF$, problematică ce prezintă însă o sferă de interes restrînsă.

În schimb se pare că marcarea granulocitelor cu ^{99m}Tc [16], ^{111}In [17] sau ^{67}Ga [18] pentru detecția și localizarea inflamațiilor acute chirurgicale ar reprezenta un domeniu cu perspective de dezvoltare mai largă pe plan diagnostic curent.

8.3. UTILIZAREA PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE ÎN EXPLORAREA METABOLISMULUI FIERULUI

8.3.1. ELEMENTE DE FEROCINETICĂ

Fierul se găsește în cantități relativ reduse în organism, dar este prezent la nivelul tuturor aparatelor și sistemelor anatomo-fiziologice, îndeplinind funcții esențiale în procesele vitale (tabela 8.1).

Scanned with OKEN Scanner

Ferocinetica explorează mişcarea biologică a fierului în organism. Cunoaşterea ciclului fierului a devenit posibilă mai ales prin cercetările efectuate cu trasori radioactivi, astfel încît cinetica PRF cu radiofier se suprapune datelor fundamentale ale fiziologiei fierului [20]. Absorbţia fierului alimentar se petrece în special la nivelul mucoasei duodenale, dar şi în restul intestinului subţire, procesul de absorbţie fiind condiţionat de o multitudine de factori [20].

TABELA 8.1

Distribuţia cantitativă a fierului în organismul uman normal [19]

Forma chimică	Cantitatea totală de fier, mg	Organul sau ţesutul
Hemoglobină	2300	eritrocite circulante
Mioglobină	105	ţesut muscular,
Feritină, hem	500—1500	ficat, splină, măduvă osoasă, intestin
Transferină	4	plasmă sanguină şi spaţiu extracelular
Fier enzimatic	25	totalitatea celulelor

Procentul de radiofier absorbit după administrarea orală variază între 19 % şi 32 % la bărbatul respectiv femeia normală, putînd să ajungă la cifre de 80—95 % în cazurile cu deficienţă marţială [21].

Preluarea plasmatică a fierului absorbit digestiv sau injectat intravenos se face de către o β_1 -globulină cu funcţie de transportor specific, denumită transferină sau siderofilină. În mod normal numai o treime din capacitatea de transport a transferinei este saturată cu fier ; în condiţii patologice capacitatea latentă de transport a siderofilinei poate fi mult modificată. Epurarea din plasmă a siderofilinei marcate este un parametru fundamental de explorare a ferocineticii.

Prin marcarea *in vivo* a transferinei cu radiofier se obţine un PRF propriu subiectului investigat ; produsul reinjectat intravenos este epurat conform unui proces multiexponenţial. Pe plan diagnostic se calculează componenta rapidă a curbei, caracterizată în mod normal prin $T_{1/2}$ de 80—120 min, componentă ce exprimă aviditatea măduvei eritropoetice pentru fier. Componentele lente ale curbei de epurare, cu $T_{1/2}$ de ordinul zilelor exprimă circulaţia Fe-siderofilinei în spaţiul extracelular [22].

Transferina depune fierul la suprafaţa eritroblaştilor din măduvă introducîndu-l în ciclul eritropoetic ; încorporarea se face mai ales de către eritroblaştii policromatofili care sînt pe cale de a-şi desăvîrşi ultimele mitoze [23]. Eritrocitele biomarcate intramedular sînt eliberate relativ rapid în circulaţie, activitatea radiofierului eritrocitar sanguin prezentînd o ascensiune progresivă ce intră în platou după 4—10 zile de la administrarea transferinei marcate.

Activitatea eritropoetică, viteza de producere a hematiilor şi durata lor de viaţă înregistrează variaţii mari, atît fiziologice cît şi patologice ; există o strînsă legătură reciprocă între durata de viaţă a hematiilor şi metabolismul medular al fierului.

Studiul metabolismului fierului a condus la descrierea a numeroase modele compartimentale ce încearcă să cuantifice ferocinetica normală sau patologică [5, 19, 22, 24]. De interes clinico-diagnostic sînt în special

Scanned with OKEN Scanner

următorii parametri normali care definesc momente succesive ale biocineticii fierului în organism :

— Fond metabolic comun (pool) al fierului plasmatic = sideremie × volum plasmatic = 34—40 mg Fe.

— Clearance plasmatic al fierului (exprimat în $T_{1/2}$) = 80—120 minute.

— Cantitatea transportată din plasmă (turnoverul fierului plasmatic)=clearance plasmatic fracţionat × pool fier plasmatic=30—50 mg/24 ore.

— Coeficientul de încorporare eritrocitară a fierului = procentul de Fe încorporat în eritrocite atunci cînd curba de încorporare intră în platou = 70—95% din activitatea injectată.

— Cantitatea de fier încorporată zilnic în eritrocite = coeficientul de incorporare eritrocitară a fierului × turnoverul fierului plasmatic=30—50 mg/24 ore.

8.3.2. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE PENTRU DETERMINĂRI ALE FEROCINETICII

În cazul metabolismului fierului dispunem de PRF care se încadrează riguros în noţiunea de trasor radioactiv, reproducînd identic ferocinetica.

Radionuclizii utilizaţi sînt ^{52}Fe, ^{55}Fe şi ^{59}Fe, produşi care, fiecare în parte, prezintă atît avantaje cît şi dezavantaje practice.

^{52}Fe produs de ciclotron cu $T_{1/2}$ fizic de 8,2 ore este avantajos pe plan radiobiologic dar nu poate fi valorificat decît pentru investigarea primelor etape ale ferocineticii, iar posibilitatea de a-l procura şi costul sînt prohibitive. Principala sa indicaţie rămîne vizualizarea distribuţiei normale sau patologice a ţesutului eritropoetic [25, 26].

^{55}Fe este dezavantajat de $T_{1/2}$ fizic lung (2,7 ani) care-i limitează uzul uman numai la situaţii de excepţie.

^{59}Fe este în prezent cel mai frecvent radionuclid folosit deşi caracteristicile sale fizice ($T_{1/2}$ de 45 zile, emisie fotonică gamma cu energie 1,09 şi 1,29 MeV) nu sînt cele mai adecvate pentru explorările medicinei nucleare.

Radionuclizii citaţi sînt administraţi sub forma a diferite PRF marcate intrinsec şi diferenţiate funcţie de procesul investigat : sulfat, gluconat sau clorură de radiofier pentru explorarea absorbţiei intestinale ; transferină marcată *in vitro* sau *in vivo* cu citrat radioferic în cazul determinărilor de ferocinetică.

Alte PRF reprezentînd precursori nemetalici ai fierului, respectiv ^{14}C-glicina şi ^{14}C-acidul δ-amino-levulinic sînt utilizate în cercetări de specialitate [27].

8.4. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN VIZUALIZAREA SPLENICĂ ŞI A MĂDUVEI OSOASE

8.4.1. PRF PENTRU VIZUALIZAREA SPLENICĂ

În explorarea splenică se folosesc două tipuri de PRF :

— eritrocite marcate şi fragilizate,

— radiocoloizi de dimensiuni adecvate.

Eritrocitele marcate și fragilizate sînt rezultatul aplicării unor tehnici de denaturare fizică sau chimică care le modifică proprietățile plastico-elastice, le transformă în sferocite, material biologic rapid sechestrat de către pulpa roșie splenică.

În cazul denaturării fizice marcarea eritrocitelor precede fragilizarea lor; ambele etape se efectuează *in vitro* folosind drept PRF $^{51}CrO_4Na_2$ sau ^{99m}Tc-Sn urmată de termodegradare prin incubare la 49,5°C, timp de 20 min. Prin această tehnică circa 80% din eritrocite se transformă în sferocite cu diametrul de aprox. 5 μm, iar restul de 20% se dispersează în fragmente mai mici de 2,5 μm [28, 29]. ^{51}Cr-eritrocitele termodenaturate sînt epurate biexponențial din circulația subiecților normali; 65—75% din activitatea injectată are un $T_{1/2}$ de 3—5 min, iar restul un $T_{1/2}$ de 30—50 min [8]. Sferocitele sînt sechestrate selectiv de către splină, dinamica sechestrării fiind corelată cu starea funcțională a microstructurii reticulului pulpei roșii ca și cu irigația splenică [29].

În cazul denaturării chimice marcarea și fragilizarea eritrocitelor se pot efectua simultan folosind ^{197}Hg-BMHP (1-bromomercuri-2-hidroxipropan marcat), PRF care realizează fragilizarea prin BMHP și marcarea prin ^{197}Hg. O fragilizare eritrocitară convenabilă se obține la cantități de 1—2 mg BMHP/ml eritrocite [29].

Biocinetica ^{197}Hg-BMHP se caracterizează prin bifazism. Într-o primă etapă, de ordinul a 1—2 ore, se produce acumularea splenică a produsului creîndu-se condiții optime pentru scintigrafierea organului. Într-o a doua etapă ^{197}Hg se desface de pe eritrocite, părăsește splina reintrînd în circulație și se acumulează la nivelul celulelor tubulare renale; la 24 ore de la injectare radioactivitatea renală atinge practic un platou, perioadă în care se poate efectua scintigrafia renală.

Vizualizarea splenică prin radiocoloizi a căpătat prioritate față de cea prin eritrocite fragilizate după ce ^{99m}Tc și ^{113m}I au devenit larg accesibili practicii medicinii nucleare. S-a arătat că radiocoloizii ale căror dimensiuni tind către 1 μm prezintă un tropism mai accentuat pentru SRE splenic decît coloizii cu dimensiuni mai reduse. În cazul majorității preparatelor de ^{99m}Tc-sulfocoloid fixarea splenică la adultul normal este de 8—10% din activitatea administrată, procentul crescînd în cazurile patologice (a se vedea § 7.1.2).

8.4.2. PRODUSE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE PENTRU VIZUALIZAREA MĂDUVEI OSOASE

Măduva osoasă normală poate fi vizualizată atît prin PRF cu localizare reticulo-endotelială cît și prin compuși cu tropism pe elementele eritropoetice (eritron).

Vizualizarea reticulo-endoteliului măduvei osoase se face de preferință cu ^{99m}Tc sau ^{113m}In coloizi, injectînd activități de 5—10 ori mai mari decît cele folosite în scintigrafia hepatosplenică. Vizualizarea măduvei osoase din coloana toracală inferioară și lombară superioară nu este posibilă întrucît imaginea este înecată de activitatea hepatică. Introducerea milimicrosferelor marcate cu ^{99m}Tc, avînd dimensiuni de 0,3—1 μm ar avantaja vizualizarea SRE medular [31]. Pe plan diagnostic se acceptă că distribuția medulară a SRE traduce adesea destul de corect modificările patologice ale distribuției eritronului, dar că există și discordanțe [32].

Scanned with OKEN Scanner

Pentru explorarea directă a topografiei elementelor intrapoetice se impune utilizarea unor radioprecursori specifici. PRF marcate cu ^{52}Fe se dovedesc cele mai adecvate pe plan farmacocinetic şi tehnico-medical dar sînt prohibitive ca posibilitate de procurare şi cost [31]. ^{59}Fe poate fi valorificat numai în conjuncţie cu scintigrafe de construcţie specială [33].

Un interes deosebit ca precursor specific de vizualizare a eritronului prezintă ^{111}indiul care, legîndu-se de transferină, ar putea reprezenta un bioanalog al radionuclizilor fierului. Rezultatele publicate pînă în prezent sînt contradictorii; o serie de autori pledează pentru utilitatea ^{111}In-transferinei [34, 35], în timp ce alte cercetări îi contestă calitatea de bioanalog al radiofierului în vizualizarea eritroidă [31, 36].

8.5. IRADIEREA PROVOCATĂ DE PRODUSELE RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN EXPLORAREA HEMATOLOGICĂ

Dozele de iradiere decurgînd din aplicarea diagnostică a PRF folosite în hematologie sînt sintetizate, după diverse lucrări [1, 29, 30, 32] în tabela 8.2.

TABELA 8.2

Doza biologică de iradiere (mrem) rezultînd din utilizarea PRF în diverse explorări hematologice

Explorarea radioizotopică	PRF utilizat	Activitate administr.	Organ critic	Doza de iradiere	
				organ critic	întreg corp
Volum plasmatic (tiroidă blocată cu lugol)	^{125}I-RISA	5—10 μCi	—	—	5—10
	^{131}I-RISA	5—10 μCi	—	—	10—20
Volum eritrocitar şi durata de viaţă a hematiilor	^{51}Cr-eritrocite	100 μCi	splină	200	70
Ferocinetică	^{59}Fe-transferină	20 μCi	măduvă hematogenă	1000	300—600
Scintigrafie splenică	^{51}Cr-eritrocite fragilizate	400 μCi	splină	1000—2000	50—100
	^{197}Hg BMHP	400 μCi	rinichi	1300	15—40
Scintigrafia măduvei eritropoetice	^{52}Fe-transferină	100 μCi	măduvă hematogenă	2500	1000
	^{59}Fe-transferină	40 μCi	măduvă hematogenă	2000	600—1200
	$^{111}In-Cl_3$	1—5 mCi	măduvă hematogenă	4000—18000	500—2500

8.6. INDICAŢII DE UTILIZARE A PRODUSELOR RADIOFARMACEUTICE ÎN EXPLORAREA HEMATOLOGICĂ

Ţinînd seama de multitudinea şi complexitatea verigilor fiziopatologice hematologice care pot fi investigate prin PRF vom separa indicaţiile tehnico-metodologice de problematica indicaţiilor diagnostice.

Scanned with OKEN Scanner

8.6.1. ASPECTE TEHNICO-METODOLOGICE

Se referă în principal la alegerea adecvată a PRF în cazul efectuării concomitente a mai multor explorări hematologice, cu folosirea simultană a doi sau chiar trei radionuclizi. Pe această linie cele mai frecvente asocieri sînt cele ce urmează.

a) Determinarea simultană a volumului plasmatic şi volumului eritrocitar, folosind fie ^{51}Cr-eritrocite + ^{125}I-RISA, fie ^{99m}Tc-eritrocite + ^{125}I-RISA ; alte variante sînt mai puţin utilizate [1].

b) Determinarea simultană a eritro- şi ferocineticii, caz în care se aplică tandemul radionuclidic clasic ^{51}Cr-eritrocite + ^{59}Fe-citrat ; spectrometria gamma realizează o separare bună a energiilor caracteristice la efectuarea determinărilor radiometrice *in vitro*, dar este mai puţin eficientă în cazul celor *in vivo* pe zonele de interes patologic (splină, ficat, măduvă osoasă sacrată etc.).

Investigarea fero-eritrocineticii poate fi suplimentată cu vizualizarea splenică caz în care informaţiile morfologice pot fi furnizate mai ales de ^{113m}In-coloizi (care prin $T_{1/2}$ fizic scurt nu împiedică decît 16—18 ore radiometriile externe ale ^{51}Cr şi ^{59}Fe), iar cele morfo-funcţionale de ^{99m}Tc-eritrocite termofragilizate.

c) Vizualizarea măduvei osoase este accesibilă diagnosticului curent pe linia SRE caz în care ^{99m}Tc-coloizii sau milimicrosferele îşi găsesc indicaţie prioritară. Ţinînd seama de activităţile injectate (10—15 mCi) o asemenea vizualizare medulară osoasă interferează circa 60 ore determinările radiometrice externe ale ^{51}Cr şi/sau ^{59}Fe ce sînt eventual administrate pentru explorări hematologice de eritro- şi/sau ferocinetică. De aici necesitatea alegerii adecvate a momentului vizualizării măduvei osoase fie cu 3 zile înaintea începerii explorărilor menţionate, fie după terminarea lor.

Indicaţiile şi valoarea ^{111}In-transferinei în vizualizarea măduvei eritropoetice nu sînt încă definitiv stabilite [31].

8.6.2. INDICAŢII DE UTILIZARE DIAGNOSTICĂ

PRF destinate explorării volumului sanguin se indică a fi folosite simultan pentru determinarea directă atît a volumului eritrocitar cît şi a celui plasmatic. În afecţiuni cronice, în care nu este necesar să se repete aceste determinări la intervale scurte de timp, opţiunea este asocierea PRF ^{51}Cr-eritrocite + ^{125}I-RISA. Aplicaţiile diagnostice ţin de sfera afecţiunilor hematologice (policitemii, anemii cu splenomegalie, disglobulinemii cu anemie), pneumologice (policitemii secundare), cardiologice (boli cianogene congenitale sau dobîndite, insuficienţe cardiace congestive, anumite forme de hipertensiune), nefrologice (insuficienţă renală acută sau cronică) şi endocrine. În afecţiuni chirurgicale acute, mai ales în şoc sau arsuri, unde se impun determinări repetate ale volemiei, tandemul radiofarmaceutic optim este condiţionat de radionuclizi cu $T_{1/2}$ fizic scurt. Avînd în vedere că dubletul ^{99m}Tc-eritrocite + ^{113m}In-transferina nu oferă condiţiile dorite de precizie a rezultatelor se preferă asocierea ^{99m}Tc-eritrocite + ^{125}I-RISA cu efectuarea unor controale ale radioactivităţii reziduale înaintea fiecărei noi determinări.

Scanned with OKEN Scanner

^{51}Cr-eritrocitele sînt preferate ca prim PRF în determinările duratei de viaţă eritrocitară. Compusul permite abordarea şi rezolvarea a importante probleme de fiziopatologie eritrocitară cum ar fi durata vieţii lor, detectarea mecanismelor corpusculare sau extraeritrocitare de distrucţie crescută, stabilirea importanţei splinei în procesele de hemoliză patologică cu implicaţiile terapeutice ce decurg, raportul între gradul de hemoliză şi insuficienţa de producţie în determinismul unor anemii, punerea în evidenţă a unor populaţii duble de hematii etc. [5]. Ţinînd seama de aportul radiometriilor externe în stabilirea elementelor fiziopatologice sus citate devine evidentă şi superioritatea diagnostică a ^{51}Cr-eritrocitelor faţă de D^{32}PF.

Studiul complex al patologiei eritrocitare impune adesea şi explorarea ciclului fierului. Ferocinetica, folosind ca PRF ^{59}Fe-citratul aduce elemente diagnostice esenţiale în hiposideremii, aplazii medulare, tulburări de maturare medulară, metaplazii mieloide, hemocromatoze etc. [5]. Într-o serie din afecţiunile citate mai sus, la care se adaugă sindroame mieloproliferative prezintă uneori interes şi vizualizarea extinderii şi topografiei măduvei hematologic active.

Vizualizarea splenică, în ultimii ani, recurge din ce în ce mai rar la PRF care a lansat-o (^{51}Cr-eritrocite alterate), datorită folosirii extensive a ^{99m}Tc-coloizilor. Indicaţiile utilizării PRF de vizualizarea splenică sînt: determinarea obiectivă a poziţiei şi dimensiunilor splenice, diagnosticul diferenţial al tumorilor de hipocondru şi flanc stîng (caz în care ^{197}Hg-BMHP este avantajat oferind oportunitatea scintigrafiei succesive a splinei şi rinichilor), demonstrarea formaţiilor ocupatoare de spaţiu intrasplenice etc. [8, 29]. Radiocoloizii nu înlocuiesc PRF „clasice" în explorarea funcţională splenică, efectuată în scop diagnostic sau de urmărire terapeutică.

De interes practic în perspectiva imediată se profilează problematica marcării leucocitelor cu oxine-chelaţi de ^{111}In, obţinîndu-se un PRF cu aplicaţii în detecţia şi vizualizarea abceselor ca şi a unor afecţiuni inflamatorii acute localizate [37].

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Br. J. Hemat.*, **25**, 801 (1973).
2. H. Macheret, *Schweiz. Med. Wschr.*, **103**, 934 (1973).
3. S.A. Berson, R.S. Yalow şi colab., *J. Clin. Invest.*, **32**, 746 (1953).
4. S.A. Bentley, *Clinics in haematology*, **6**, 601 (1977).
5. Y. Najean, „Sang et moelle" în „Médecine Nucleaire", vol. 2, Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1975.
6. I.O. Szymansky, C.R. Valeri, *Br. J. Hemat.*, **19**, 397 (1970).
7. S.A. Bentley, H.I. Glass şi colab. *Br. J. Hemat.*, **26**, 170 (1974).
8. J. Fischer, R. Wolf „Die Milzszintigraphie", G. Thieme, Stuttgart, 1968.
9. J. Fischer, R. Wolf, A. Leon, *Fortschr. Geb. Roentgenstr. Nuklearmed.*, **106**, 51 (1967).
10. W.C. Eckelman, T.D. Smith şi colab., Part. 2, Cap. 5, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975.
11. F.N. Hege, G.W. Hamilton şi colab., *J. Nucl. Med.*, **19**, 129 (1978).
12. E.M. Stokely, R.W. Parkey şi colab., *Radiology*, **120**, 433 (1976).
13. R.G. Hamilton, P.O. Alderson, *J. Nucl. Med.*, **18**, 1010 (1977).
14. L. Garby, *Br. J. Hemat.*, **8**, 15 (1962).
15. Y. Najean, N. Ardaillou, C. Dresch, „Utilisation des techniques isotopiques en hématologie", J.B. Baillière Ed., Paris, 1969.
16. D. English, B. Anderse, *J. Nucl. Med.*, **18**, 289 (1977).

Scanned with OKEN Scanner

17. R.E. Coleman, M.J. Welch și colab., „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, p. 47, IAEA, Vienna, 1977.
18. F.J. Kroeger, R.L. Burleson, *Surg. Gyneaol. Obstet.*, **144**, 741 (1977).
19. L. Garby, J.C. Vuille, în „Compartments pools and spaces in medical physiology", USAEC, Oak Ridge, 1967, p. 361.
20. Al. Vilcu, „Eritrocitul", Edit. medicală, București, 1977.
21. H.C. Heinrich, H. Bartels, *Klin. Wschr.*, **45**, 553 (1967).
22. I. Cavill, C. Ricketts, A. Jacobs, *Clinics in haematology*, **6**, 583 (1977).
23. Y. Najean, C. Dresch, A. Faille, în „Iron Deficiency", Academic Press, London, 1970.
24. M. Pollycove, R. Mortimer, *J. Clin. Invest.*, **40**, 753 (1961).
25. H.O. Anger, D. Van Dyke, *Science*, **144**, 1587 (1964).
26. J.E. Petit, S.M. Lewis și colab., *Br. J. Hematol.*, **34**, 465 (1976).
27. H. Heimpel, *Clinics in haematology*, **6**, 657 (1977).
28. P.M. Johnson, D.C. Herion și colab., *Radiology*, **74**, 99 (1960).
29. J. Fischer, R. Wolf, „Nuclear Medicine in Hematology", Hoechst, 1968.
30. J.D. Rain, „Utilisation de la scintigraphie en hématologie", în „Medicine Nucleaire", vol. 2, Flammarion Médicine Sciences, Paris, 1975.
31. G. Subramanian, J.G. Mc. Afee și colab., în „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, IAEA, Vienna, 1977, p. 83.
32. P. Mc Intyre, în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 343.
33. T.K. Chaudhuri, J.C. Ehrhardt și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 667 (1974).
34. J.J. Touya, G.S. Lee și colab., „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, IAEA, Vienna, 1977.
35. M.K. Jeffcoat, J. Mc. Neil și colab., *J. Nucl. Med.*, **19**, 496 (1978).
36. M.V. Merrick, E.C. Gordon-Smith și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 66 (1975).
37. D.A. Goodwin, *J. Nucl. Med.*, **19**, 557 (1978).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9

RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN SCINTIGRAFIA OSOASĂ

Interesul pentru utilizarea diagnostică a radionuclizilor osteotropi a fost destul de limitat inițial, întrucît lipsea PRF care să satisfacă criteriile impuse unui asemenea produs ; introducerea ^{85}Sr în medicina nucleară [1] a permis vizualizări osoase de emisie dar servitutile tehnice și radiobiologice ale acestui radionuclid îi limitează utilizarea în practica clinică curentă. În perioada 1960—1970 cercetări susținute analizează peste 20 de radionuclizi potențial utilizabili pentru scintigrafierea scheletului și reușesc să valorifice două produse radiofarmaceutice de viață fizică scurtă, ^{87m}Sr și ^{18}F, ambii cunoscînd o folosire clinică mai largă [2]. Subramanian și colab. [3] deschid seria unor publicații soldate cu introducerea unei noi clase de compuși osteotropi destinați scintigrafiei scheletice : polifosfații și fosfonații marcați cu ^{99m}tehneţiu. PRF osteotrope marcate cu ^{99m}Tc (RFOT-^{99m}Tc) cîștigă rapid cvasiexclusivitate în investigarea scintigrafică clinică, celelalte radiofarmaceutice rămînînd a fi utilizate fie pentru probleme speciale de cercetare (^{47}Ca, ^{18}F) fie din considerente de economicitate aflate însă în dezacord cu criteriile radiobiologice (cazul ^{85}Sr).

În acesată optică vom trece în revistă numai unele aspecte semnificative ale PRF de interes particular și vom insista asupra radiofarmaceuticelor de interes larg și general, radiofarmaceutice osteotrope marcate cu ^{99m}tehneţiu (RFOT-^{99m}Tc) ce includ : ^{99m}Tc-polifosfații, ^{99m}Tc-difosfonații și ^{99m}Tc-pirofosfatul.

9.1. CALITĂȚILE RADIOFARMACEUTICULUI IDEAL DESTINAT SCINTIGRAFIEI OSOASE

Cerințele ce trebuie cumulativ îndeplinite de radiotrasorul ideal destinat scintigrafiei osoase pot fi grupate în cerințe general valabile pentru toate PRF de uz scintigrafic (a se vedea 1.2.1) și specificații particulare domeniului vizualizării scheletice de emisie.

Cerințele particulare domeniului scintigrafiei osoase includ următoarele specificații ale PRF ideal : a) osteotropism marcat : fixare osoasă rapidă a unui procent important din doza administrată ; b) osteotropism diferențiat : concentrare mai intensă în osul patologic față de cel normal cu realizarea unui raport $\frac{\text{activitate os patologic}}{\text{activitate os normal}}$ crescut ; c) specificitate etiologică : concentrarea diferențiată în osul patologic funcție de substratul lezional (tumoral, inflamator, dismetabolic etc.) ; d) absența tropismului

pentru țesuturile moi; e) clearance plasmatic rapid cu realizarea unui raport $\frac{\text{activitate osoasă}}{\text{activitate țesuturi moi}}$ crescut; f) eliminare rapidă și exclusiv urinară a fracțiunii de radiofarmaceutic ce nu se fixează osos; g) absența eliminării la nivelul organelor parenchimatoase sau cavitare pentru a nu masca leziuni osoase supra- și/sau subiacente; h) iradierea redusă a osului și măduvei osoase. Nici unul din produsele existente nu îndeplinesc integral calitățile radiofarmaceuticului ideal destinat scintigrafiei osoase.

9.2. RADIOIZOTOPII STRONȚIULUI

Radioizotopii stronțiului cu utilizare radiofarmaceutică sînt ^{85}Sr-nitratul și ^{87m}Sr.

Elemente de biocinetică. Acestea sînt următoarele:

Clearance-ul plasmatic. După injectarea intravenoasă scăderea concentrației plasmatice a ^{85}Sr (sau ^{87m}Sr) este mult mai lentă decît cea a altor PRF osteotrope. La 5 ore de la administrare se găsesc încă în sînge concentrații de aproximativ 4 %l plasmă din activitatea totală [4]. Curba lentă de epurare plasmatică recunoaște în principal două cauze: a) stronțiul, asemenea calciului, se leagă într-un procent destul de ridicat de proteinele plasmatice; b) clearance-ul renal al stronțiului este mai scăzut decît al altor PRF osteotrope.

Excreție. Eliminarea urinară la 5 ore se cifrează la 2,7 — 8,9 % din doza de ^{85}Sr-nitrat administrată intravenos, eliminare evident mai mică decît cea a ^{18}fluorului [4]. Eliminarea cumulativă urinară a ^{85}Sr în primele 48 de ore este de numai 10—30 % din doza administrată; în următoarele 5 zile se mai excretă circa 5—15 % din activitatea injectată.

Asemenea calciului, ^{85}Sr se excretă și prin fecale, eliminarea digestivă reprezentînd circa 1/4 din cea urinară.

Eliminarea lentă din organism a radioizotopilor stronțiului se repercutează nefavorabil asupra meritelor acestora în vizualizarea osoasă; fondul sanguin rămîne ridicat în primele 24 de ore, iar prezența radionuclidului în intestin se interferează cu scintigrafierea corectă a structurilor osoase subiacente.

Fixarea osoasă a radionuclizilor stronțiului este rapidă.

Cinetica fixării pe osul adult a unor bioanalogi radioactivi ai calciului (printre care și ^{85}Sr) recunoaște cel puțin trei faze [5]:

a) Faza de schimb rapid — cu durata de o oră — timp în care radiotrasorul se schimbă cu calciul acelor structuri osoase care au cea mai mare expunere la fluidele circulante; suprafețele subperiostale, endostale, suprafețele trabeculare iar la nivelul osului compact pereții cavităților de resorbție.

Pentru $^{85}SrCl_2$ s-a găsit [2] o creștere a radioactivității osoase care satisface relația $1 - e^{-\lambda t}$, valorile lui t variind de la un minut în treimea medie a femurului normal pînă la 8 minute la nivelul rotulei normale. Această relație este valabilă numai pe intervalul primei ore de la injectare cînd se realizează pînă la 90 % din maximul fixării osoase finale.

b) Faza de schimb lent, este concepută ca o difuziune a atomilor din canaliculii osoși către limita teritoriului canalicular cu reîntoarceri întîmplătoare în lumenul canalicular.

Scanned with OKEN Scanner

c) Faza de retenţie pe termen lung, valabilă mai ales în radiotoxicologie, se soldează cu depozitarea osoasă a radionuclidului pe termen de zeci de ani.

Două grupe de fapte esenţiale pentru scintigrafia osoasă se referă la existenţa unor variaţii ale vitezelor de schimb ale trasorului în diferite părţi ale scheletului şi respectiv la vitezele diferite de schimb existente la nivelul osului adult faţă de cele ale osului în creştere ca şi faţă de osul patologic. Vitezele diferite de schimb în diferite părţi ale scheletului normal explică existenţa zonelor de acumulare crescută a ^{85}Sr pe imaginea scintigrafică normală (extremităţile oaselor lungi — os trabecular — zona periacetabulară, oasele carpului şi tarsului, vertebrele situate între D_8 şi L_5).

Fixarea crescută a PRF pe zonele de os patologic în comparaţie cu cele normale fundamentează diagnosticul scintigrafic al afecţiunilor osoase. Substratul fiziopatologic al hiperfixării PRF osteotrope este constituit de modificările vascularizaţiei şi activităţii metabolice la nivelul osului patologic, fixarea ^{85}Sr fiind net crescută la nivelul ţesutului osteoid imatur, pe cale de mineralizare. Ţinînd seama de faptul că procesele patologice osteolitice, cu distrucţie osoasă, sînt însoţite cel mai adesea de procese osteogenetice reactive cu osteoid imatur, rezultă că marea majoritate a leziunilor osoase se vor putea obiectiviza datorită unor hiperfixări locale ale PRF osteotrop.

Charkes şi colab. [6], prin corelări clinico-radiologice, histopatologice şi scintigrafice la om, stabilesc mai exact substratul fiziopatologic al hiperfixării osoase de ^{85}Sr. Autorii clasifică evoluţia dinamică a osteogenezei reactive în 3 faze. În faza I procesul de osteogeneză reactivă este foarte intens dar modificările calcice sînt încă insuficiente pentru a fi obiectivizate radiografic; ca atare scintigrafia osoasă cu ^{85}Sr este pozitivă, iar examenul radiografic negativ. Faza a II-a se caracterizează prin remanieri metabolice intense cu modificări marcate în conţinutul calcic; scintigrafia osoasă este pozitivă, în concordanţă acum cu radiografia care înregistrează şi ea modificări de transparenţă osoasă. În faza a III-a, pe măsură ce procesul reactiv se finalizează în formarea de os matur scade şi ritmul osteogenezei; pe plan scintigrafic hiperfixarea ^{85}Sr diminuează sau se normalizează; radiografic se pot evidenţia osteodensificări.

În lumina datelor de mai sus interpretarea modificărilor de fixare osoasă a ^{85}Sr trebuie permanent corelată cu substratul lor morfofiziologic, în principal osteogeneza fiziologică sau osteogeneza reactivă în cadrul unui proces patologic. Formularea lui Charkes [7] care arată că scintigrafia scheletică măsoară activitatea metabolică a procesului reactiv osos este fundamentală pentru înţelegerea şi interpretarea imaginilor obţinute cu PRF osteotrope.

Fixarea extrascheletică. Evidenţiată mai ales în cazul ^{87m}Sr, fixarea extrascheletică a radiostronţiului pe metastazele unor tumori maligne, recunoaşte mai multe explicaţii posibile [8, 9]: a) fixarea pe metastazele extrascheletice ale unor tumori osoase (în special metastazele pulmonare ale osteosarcoamelor) poate avea drept mecanism existenţa proceselor de osteogeneză cu calcifieri prezente la nivelul metastazelor; b) fixarea pe metastazele cancerelor colo-rectale s-ar justifica prin faptul că radiostronţiul este concentrat activ şi excretat de mucoasa colică normală; celulele metastazice care ating un grad suficient de diferenţiere ar putea dobîndi şi capacitatea de concentrare a stronţiului; c) fixarea pe tumori primitive

extrascheletice (cancer de sîn în special) sau pe metastazele unor asemenea tumori s-ar putea explica prin legarea radiostronțiului de proteinele plasmatice, cu vizualizarea nespecifică a procesului tumoral.

9.3. FLUORUL

Introdus în scintigrafia osoasă încă din 1962 de către Blau și colab., fluorul-18 — în pofida calităților sale farmacocinetice — nu a cunoscut o largă utilizare medicală date fiind atît dificultățile de procurare, cît și costul său ridicat. Interesul prezent pentru ^{18}F în explorarea osoasă este justificat însă de locul unic pe care îl ocupă între bioanalogii calciului ca PRF de viață fizică scurtă cu osteotropism excelent și clearance urinar rapid.

Elemente de farmacocinetică. Calea de administrare a ^{18}F este preferențial cea intravenoasă. Calea orală poate fi și ea folosită, absorbția intestinală a ^{18}F fiind rapidă și completă, cu atingerea unei activități sanguine maxime la mai puțin de 15 minute de la ingestie. Clearance-ul plasmatic al ^{18}F este rapid, la aceasta concurînd atît rata accelerată de fixare osoasă, cît și de eliminare urinară. Dispariția plasmatică a ^{18}F în primele 4 ore după injectarea intravenoasă este un proces biexponențial, prima exponențială (cu un $T_{1/2}$ mediu de 24 min) surprinzînd în principal transferul scheletic unidirecțional, iar a doua exponențială (cu un $T_{1/2}$ mediu de 198 min) exprimînd mai ales clearance-ul renal al radiofluorului [10]. Scăderea concentrației plasmatice a ^{18}F după injectare i.v. este mult mai rapidă decît a radioizotopilor calciului (^{47}Ca, ^{45}Ca) sau a celor ai stronțiului [4]. Clearance-ul plasmatic rapid al ^{18}F decurge și din slaba sa legare de proteinele plasmatice; la 3 ore de la injectare numai aproximativ 15% din radioactivitatea plasmatică este legată proteic.

În ceea ce privește eliminarea urinară, în primele 3 ore aceasta este răspunzătoare de 22—24% din doza injectată [11].

Fixarea osoasă a ^{18}F este rapidă, caracterizată de aceeași funcție și parametri cantitativi ca și cea a ^{85}Sr [2]. S-a arătat [11, 12] că extracția osoasă a ^{18}F din sînge este de 100%, radiofluorul fiind astfel un indicator adecvat al perfuziei osoase. Mecanismul fixării osoase a fluorului este incomplet cunoscut; ^{18}F injectat sub forma de fluorură, este încorporat rapid în os atît prin schimb cu OH^- la nivelul straturilor de suprafață ale cristalelor de hidroxiapatită existente cît și prin fixarea în locul OH^- în cristalele nou formate. Anionii F^- și OH^- au aceeași încărcare și sînt aproape de aceleași dimensiuni, ceea ce explică, probabil, schimbul și substituția rapidă. În ceea ce privește mecanismul fixării ^{18}F pe osul patologic datele fundamentale expuse pentru ^{85}Sr sînt în general valabile și pentru radiofluor, tropismul maxim fiind manifestat pentru zonele de țesut osteoid. Ținînd seama de extracția aproape totală a ^{18}F la prima circulație prin os, se consideră fixarea scheletică a ionului de ^{18}F ca dependentă în primul rînd de rata perfuziei sanguine osoase [12].

Datele de fluorocinetică indică faptul că acest anion satisface o serie din caracteristicile PRF ideal, realizînd o fixare osoasă rapidă, rapoarte os normal/părți moi și os normal/os patologic ridicate, iradiere redusă, absența fixării la nivelul organelor parenchimatoase sau cavitare (exceptînd acumularea vezicală a trasorului eliminat urinar). Limitele utilizării largi a ^{18}F în scintigrafia osoasă au fost impuse în mai mică măsură de

tehnologia vizualizării diagnostice de emisie cît mai ales de criterii economico-organizatorice (procurare dificilă, cost ridicat). Într-adevăr, $T_{1/2}$ fizic scurt al ^{18}F îl face accesibil numai laboratoarelor aflate în vecinătatea unui reactor sau ciclotron, iar livrarea sa în condiţii comerciale duce la cost radiofarmaceutic/scintigrafie neconvenabil în comparaţie cu cel ale produselor osteotrope marcate cu ^{99m}Tc.

9.4. RADIOFARMACEUTICE OSTEOTROPE MARCATE CU ^{99m}TECHNEŢIU

-RFOT-^{99m}Tc-(polifosfaţi, pirofosfaţi, difosfonat)

O serie de cercetări experimentale publicate de Fleisch şi colab. încă din anul 1961 au demonstrat tropismul polifosfaţilor, pirofosfatului şi difosfonaţilor pentru hidroxiapatită ca şi unele acţiuni inhibitoare pe care aceşti compuşi le exercită *in vivo* şi *in vitro* asupra mecanismului de calcificare [13]. Subramanian şi McAfee [3] publică primele rezultate obţinute în vizualizarea osoasă cu un tripolifosfat marcat stabil cu ^{99m}Tc în prezenţa ionului stanos. Perez şi colab. introduc ^{99m}Tc-pirofosfatul, iar Yano şi colab. ^{99m}Tc-difosfonatul [14, 15]. Efectul descoperirii acestor radiofarmaceutice în anii 1971—1972 a fost imediat evident, ducînd la dezvoltarea rapidă a scintigrafiei osoase [16].

9.4.1. NOMENCLATURA — STRUCTURA

Pentru a se evita confuziile generate de variatele denumiri comerciale ca şi de diversele prescurtări folosite în publicaţiile ştiinţifice s-au adoptat denumiri şi prescurtări pentru principalele RFOT-^{99m}Tc (tabela 9.1) [17].

TABELA 9.1

Nomenclatura RFOT-^{99m}Tc

Denumirea	Prescurtarea unificată adoptată	Alte prescurtări utilizate anterior	Formula acidului
Pirofosfat	PP_1	Tc-Pyro Tc-PP Tc-Py-P	$H_2O_3P-O-PO_3H_2$
Polifosfat	PP_x $(x = n + 2)$	Tc-Poly Tc-PP	$H_2O_3P-\left[\begin{array}{c}O\\\|\\O-P\\\|\\OH\end{array}\right]_n-OPO_3H_2$
1-Hidroxietan-difosfonat	HEDP	HEDSPA EHDP	$CH_3-C(OH)(PO_3H_2)_2$
Metilen-difosfonat	MDP	—	$H_2C(PO_3H_2)_2$

Cînd ne referim la radiofarmaceutice marcate cu technețiu, prescurtarea este precedată de ^{99m}Tc (^{99m}Tc-PP_1, ^{99m}Tc-PP_x etc.).

9.4.2. FARMACOCINETICA

Aplicațiile clinice ale RFOT-^{99m}Tc depășesc cu mult în amploare studiile de farmacocinetică umană, acestea din urmă apărînd adesea după aplicarea clinico-diagnostică a produsului. Se impun a fi sistematizate cel puțin două ordine de date privind RFOT-^{99m}Tc și anume atît farmacocinetica la omul normal, cît și farmacocinetica la purtătorii de procese patologice osoase. Multiplicînd aceste două abordări cu numărul produselor descrise în această clasă apare clar complexitatea problematicii date, neacoperită încă de caracterul dispersat și neuniform [18] al lucrărilor existente. Date de referință cuprind în special publicațiile lui Subramanian [3, 19, 20], Citrin și colab. [21, 22, 23, 24], Krishnamurthy, Tubis și colab. [10, 25, 26].

9.4.2.1. Farmacocinetica RFOT-^{99m}Tc la subiecții normali. Cuprinde următoarele elemente:

Clearance-ul plasmatic. Epurarea plasmatică a RFOT-^{99m}Tc este în general rapidă; diferențele existente în comportarea variatelor produse sînt uneori semnificative.

Deși se descrie și o componentă inițială foarte rapidă, de ordinul 1—2 minute în clearance-ul plasmatic al RFOT-^{99m}Tc, majoritatea autorilor nu o consideră (atribuind-o, probabil, mixicei intravasculare inițiale) și tratează epurarea sanguină drept un proces biexponențial caracterizat prin timpi de înjumătățire de ordinul zecilor de minute și, respectiv, orelor. Se poate stabili [19] următoarea scară descrescătoare a vitezei de epurare sanguină: cel mai rapid clearance sanguin îl are MDP ($T_{1/2}$ plasmatic de 0,85 și 14,5 ore epurînd 20,1 și 1,5% din doza administrată), apoi HEDP ($T_{1/2}$ de 1,04 și 7,6 ore cu epurarea a 21,5 și 2,5% din doză), PP_1 ($T_{1/2}$ de 0,64 și 53,7 ore cu epurarea a 18,3 și 7,4% din doză) și ultimul PP_x ($T_{1/2}$ de 0,82 și 23,5 ore cu epurarea a 19,3 și 9,4% din doză). În alte cercetări [22] s-a găsit pentru HEDP un clearance plasmatic biexponențial cuantificat de funcția $A_{(t)} = 4{,}36^{-0{,}032\,t} + 2{,}19^{-0{,}0045\,t}$, unde constantele de dispariție sînt exprimate în $minute^{-1}$ și corespund la timpi de înjumătățire de 21,8 și, respectiv, 155 min. Reies diferențele obținute de diferiți autori în aprecierea biocineticii HEDP, diferențe explicate atît prin metodologii variate de investigație cît și, probabil, prin lipsa de identitate a produselor testate.

În ceea ce privește fixarea RFOT-^{99m}Tc pe proteinele plasmatice, afinitatea fosfaților este mai mare decît cea a difosfonaților [19]. Pentru PP_1 și PP_x 40—50% din activitatea plasmatică este legată de proteine în prima oră și 55—60% la 3 ore; pentru MDP și HEDP procentele sînt de 30, respectiv 25% la o oră, 45, respectiv 30% la trei ore și 100, respectiv 45% la 24 de ore.

De interes pentru aprecierea raportului os/părți moi este procentul de radioactivitate din doză rămas în sînge la 3 și la 6 ore; acesta se cifrează la valori medii de 3,22 și respectiv 1,26% pentru MDP, 4,68 și respectiv 1,89% pentru HEDP, 7,95 și respectiv 6,83% pentru PP_1, iar pentru PP_x de 10, 6 și respectiv 8,39%.

Eliminarea urinară. Este principala cale de excreție a RFOT-^{99m}Tc, iar în cadrul investigațiilor de vizualizare poate fi considerată din punct de

Scanned with OKEN Scanner

vedere practic și ca singura cale de eliminare a trasorului. În realitate cercetările experimentale efectuate la cîine, utilizînd RFOT marcate cu ^{95m}Tc ($T_{1/2}$ fizic de 60 de zile), demonstrează existența unei eliminări digestive a trasorului, foarte redusă însă, atingînd în 24 de ore 0,4% din doză pentru MDP, 2,8% pentru HEDP și 2,1% pentru PP_x [19].

Pentru voluntarii tineri, sănătoși, media de excreție urinară cumulativă la 4 ore de la injectare, exprimată în procente din doză, reliefează de asemenea diferențe de biocinetică între difosfonați, mai rapid excretați (aproximativ 61%) și pirofosfat (46%), respectiv polifosfat (42,5%).

Fixarea osoasă. Fixarea osoasă este rapidă la subiecții normali, pentru HEDP constatîndu-se o acumulare osoasă rapidă pînă la 60 minute cînd se atinge 80% din valoarea de la 6 ore; fixarea osoasă poate fi descrisă printr-o funcție biexponențială avînd $T_{1/2}$ de 11,8 min și respectiv 53 min. [21, 22]. Deși la subiecții normali cea mai mare parte a fixării osoase se produce încă din prima oră, raportul radioactivitate osoasă/radioactivitate părți moi crește în continuare prin scăderea numitorului, determinată de excreția urinară a radiofarmaceuticului; dacă la două ore valorile raportului sînt apropiate pentru ^{99m}Tc-HEDP, ^{99m}Tc-PP_1 și ^{99m}Tc-PP_x (respectiv 2,12; 2,19; 2,11) la 6 ore ele se diferențiază semnificativ (respectiv 3,01; 2,69; 2,32).

9.4.2.2. Farmacocinetica RFOT-^{99m}Tc la bolnavii purtători de tumori osoase. Cu toate că în prezent publicațiile nu tratează separat biocinetica RFOT-^{99m}Tc la subiecții normali față de bolnavii purtători de tumori osoase primare sau secundare studiul rezultatelor existente permit să sesizăm probabilitatea existenței unor asemenea diferențe. Comparînd datele lui Krishnamurthy și colab. [10, 25, 26] cu cele ale lui Subramanian [19, 20] se desprinde concluzia că clearance-ul plasmatic al RFOT-^{99m}Tc este mai rapid la purtători de tumori osoase decît la normali, iar procentul din doză ce se elimină urinar este mai redus în cazurile patologice (tabela 9.2).

TABELA 9.2

Diferențe în biocinetica unor RFOT la subiecții normali față de bolnavii cu tumori osoase

	Clearance plasmatic ($T_{1/2}$ exponențială I-a în ore)		Eliminare urinară la 4 ore (% din doza administrată)	
	normali	tumori osoase	normali	tumori osoase
^{99m}Tc-HEDP	1,04	0,5	60,8	33,8
^{99m}Tc-PP_1	0,64	0,22	45,9	28
^{99m}Tc-PP_x	0,82	0,3	42,5	33,3

Deși datele sînt publicate de grupuri diferite, folosind metodologii de investigație ce nu se suprapun total, diferențele în valoarea primei exponențiale a clearance-ului plasmatic (care se referă la fixarea scheletică) sugerează o acumulare osoasă mai rapidă la grupul bolnavilor cu tumori osoase; eliminarea mai scăzută a RFOT-^{99m}Tc la același grup confirmă acest punct de vedere. Aceste diferențe apar legitime dacă ne referim

Scanned with OKEN Scanner

a fixarea diferenţială a RFOT-^{99m}Tc pe osul patologic comparativ cu cel normal. Spre deosebire de osul normal fixarea în osul patologic se continuă activ şi după prima oră, astfel încît pentru HEDP, la 4 ore, activitatea fixată în osul patologic este de aproximativ 3 ori mai mare decît cea din osul normal (fig. 9.1). Urmărirea dinamică a fixării RFOT-^{99m}Tc pe osul patologic, în comparaţie cu fixarea pe osul normal, poate da informaţii asupra activităţii biologice a tumorii şi ar putea fi utilizată şi în aprecierea răspunsului terapeutic.

9.4.3. MECANISMUL FIXĂRII OSOASE A RFOT-^{99m}Tc

Deşi utilizate iniţial în terapeutică pentru efectul lor farmacologic substanţele din grupa polifosfaţilor şi fosfonaţilor prezintă mecanisme de fixare şi acţiune osoasă încă incomplet cunoscute. Fleisch [13] trecînd în revistă acţiunile farmacologice ale PP_i şi HEDP îi caracterizează drept produse ce inhibă calcifierea osoasă şi extraosoasă; de aici indicaţia utilităţii terapeutice în unele tulburări de metabolism fosfocalcic (boala Paget), în miozita osificantă ca şi posibilul rol terapeutic în litiazele urinare.

Introducerea RFOT-^{99m}Tc în medicina nucleară a stimulat interesul pentru elucidarea mecanismului fixării lor osoase şi a multiplicat studiile centrate pe această temă. Folosindu-se un model experimental care permite studiul independent al proceselor de osteogeneză şi respectiv de resorbţie osoasă s-a conchis că numai sistemul osteoformator acumulează PP_x-^{99m}Tc în concentraţii mai mari decît cele normale şi că deci imaginile pozitive osoase reflectă activitatea acestui sistem [27]. Componenta de osteogeneză ar fi deci responsabilă pentru vizualizarea zonelor patologice, chiar atunci cînd leziunile principale sînt de osteoliză; în acest ultim caz obţinerea imaginii patologice de hiperfixare osoasă se explică prin răspunsul osteogenic al zonelor de imediată vecinătate.

Fundamentale pentru explicarea mecanismului biochimic al localizării difosfonaţilor apar rezultatele obţinute prin cercetarea acţiunii de inhibiţie enzimatică exercitată de aceste produse [28]. Aprofundînd datele rezultate din utilizarea terapeutică a difosfonaţilor s-a verificat ipoteza conform căreia unele enzime ar putea reprezenta receptorii tisulari care fixează difosfonaţii şi analogii lor. S-a demonstrat că difosfonatul inhibă intens acţiunea fosfatazei alcaline, moderat pe cea a fosfatazei acide şi că nu produce nici o modificare asupra activităţii transaminazei oxalacetice şi respectiv asupra lactic-dehidrogenezei. Este posibil ca inhibiţia exercitată *in vitro* de difosfonat asupra activităţii fosfatazelor alcaline şi acide să rezulte din formarea unui complex enzimă — difosfonat. Cunoscut fiind faptul că celulele osteoblastice sînt caracterizate prin înaltul lor conţinut în fosfatază alcalină, enzimă ce pare a fi implicată în procesul iniţial de calcifiere, se schiţează posibilitatea integrării datelor de mai sus într-un concept unitar privind mecanismul localizării osoase a difosfonaţilor. Desigur că explicaţia nu este completă şi suficientă pentru a justifica tropismul RFOT-^{99m}Tc numai pentru fosfataza alcalină osoasă şi absenţa inhibiţiei aceleiaşi enzime la nivelul altor organe (ficat de ex.) în care enzima este prezentă în concentraţii mari.

Este posibil ca fixarea osoasă a RFOT-^{99m}Tc să recunoască mecanisme multiple, funcţie de substratul lezional.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările referitoare la cinetica ^{99m}Tc-PP$_1$ în boli osoase metabolice (osteomalacie prin deficienţa vit. D, hiperparatiroidism primar şi secundar, boală Paget), ca şi cele privind cinetica RFOT-^{99m}Tc pe un model de rahitism experimental, pledează pentru considerarea colagenului imatur drept posibil loc de fixare osoasă a acestor radiofarmaceutice [29, 30]. Colagenul imatur este caracterizat printr-un număr mai redus de punţi încrucişate intra- şi intermoleculare şi ca atare printr-un număr mai crescut de locuri potenţiale de legare. Matricea osoasă recent sintetizată are un conţinut crescut de colagen imatur care ar fixa preferenţial $^{99m}TcO_4^-$ şi ^{99m}Tc-PP$_1$. Această ipoteză este argumentată prin demonstrarea unei corelaţii semnificative între raportul hidroxiprolină/creatinină urinară şi raportul radioactivitate osoasă/radioactivitate părţi moi pentru ^{99m}Tc-PP$_1$ la bolnavii cu diferite afecţiuni osoase metabolice [31]. Corelarea fixării osoase a RFOT-^{99m}Tc cu metabolismul colagenului imatur ajută la descifrarea mecanismului de fixare osoasă a acestor PRF în unele cazuri în care activitatea osteoblastică nu este intensificată dar hiperfixarea osoasă este totuşi prezentă (osteomalacie).

Dacă pe plan histo-morfologic factorii principali de promovare a hiperfixării osoase a RFOT-^{99m}Tc par a fi atît intensificarea activităţii osteoblaştilor, cît şi existenţa colagenului imatur, pe plan fiziopatologic un rol primordial este jucat de creşterea irigaţiei sanguine locale.

Date recente sugerează că hiperfixarea scheletică a radiofarmaceuticelor osteotrope are loc în două etape : în prima fază, foarte rapidă, ca urmare a irigaţiei crescute se produce acumularea marcată a izotopului în lichidul extracelular din zona lezată ; în cea de-a doua fază, mai lentă, PRF este concentrat treptat de către ţesutul osteoid imatur ce constituie substratul osteogenezei reactive [32]. Se poate deci aprecia că în mecanismul fixării osoase a RFOT-^{99m}Tc intervin factori multipli, cu pondere diferită funcţie de procesul considerat dar că fundamentale rămîn creşterea irigaţiei sanguine şi activitatea metabolică a ţesutului osteoid. În ceea ce priveşte biodegradarea RFOT-^{99m}Tc se apreciază că legăturile P—C—P ale difosfonatului sînt mai rezistente la hidroliza enzimatică *in vivo* decît cele de tipul P—O—P ale polifosfaţilor [33].

9.4.4. FIXAREA EXTRASCHELETICĂ A RFOT-^{99m}Tc

La puţin timp de la introducerea în practica diagnostică a acestei grupe de compuşi, sînt semnalate primele cazuri de concentrare a PP$_x$-^{99m}Tc în cancere primare de sîn [34]. Ulterior, un număr crescînd de publicaţii contribuie la identificarea acestei problematici ; lista afecţiunilor în care fixarea extrascheletică a RFOT-^{99m}Tc poate fi prezentă este variată şi în continuă completare. O încercare de grupare după criterii etio-patogenice, permite sistematizarea a cel puţin patru grupe de condiţii fiziopatologice în care fenomenul este prezent.

9.4.4.1. **Calcifieri extrascheletice.** Calcifierea extrascheletică este un proces morfopatologic bine cunoscut, pus în lumină pe plan diagnostic prin metodele radiologiei clasice. Hiperfixarea RFOT-^{99m}Tc pe aceste leziuni subliniază uneori caracterul lor metabolic activ ; alteori această grupă de radiofarmaceutice osteotrope relevă prezenţa ţesutului osteoformator extrascheletic cu mult înainte ca acesta să capete concentraţia de calciu necesară pentru a fi detectat radiologic drept formaţie radioopacă.

Scanned with OKEN Scanner

a) Metastazele pulmonare ale osteosarcoamelor, sînt uneori suficient de diferenţiate pentru a produce osteogeneză la nivelul depozitului secundar. Prezenţa osteoidului la nivelul leziunilor, osteoid microscopic sau macroscopic, explică în aceste cazuri fixarea extrascheletică dar totuşi osoasă a RFOT-^{99m}Tc.

b) Calcifierile unor tumori maligne sau benigne de origină extraosoasă se diferenţiază de precedentele prin faptul că în acest caz calcifierea se integrează proceselor necrobiotice tisulare. Mecanismul fixării rămîne însă fundamental acelaşi, respectiv afinitatea pentru hidroxiapatită. Au fost semnalate asemenea cazuri în tumori maligne ovariene, renale, ale vezicii urinare, în tumori hepatice ca şi într-un caz de fibrom uterin cu calcifieri. Lista patologiei susceptibile de acest fenomen este în continuă creştere.

c) Condiţiile metabolice însoţite de calcifieri tisulare cum ar fi, în principal, insuficienţele renale cronice, hiperparatiroidismul şi hipervitaminoza D. În insuficienţele renale cronice se pot depista calcifieri microscopice pulmonare, gastrice sau renale încă din fazele incipiente ale bolii; în aceste cazuri ca şi în celelalte entităţi nosologice citate, se poate întîlni hiperfixarea tisulară a RFOT-^{99m}Tc cu mult înaintea apariţiei vizualizării radiografice.

9.4.4.2. **Tumori maligne ale părţilor moi, fără calcifieri tisulare.** Există în prezent suficiente date care ne permit descrierea separată a acumulării RFOT-^{99m}Tc la nivelul unor tumori maligne extrascheletice, lipsite de calcifieri tisulare. În acest grup se înscriu în special cancerele primitive de sîn [35] şi tumorile colonului [9, 36]. Incidenţa fixării radiofarmaceuticelor osteotrope pe aceste tipuri de tumori este redusă, dar cazurile existente sînt indiscutabile. Mecanismul invocat, în special pentru cancerul de sîn, este cel al concentraţiilor crescute de enzime fosfatazice în ţesutul tumoral, enzime care, după cum s-a arătat, ar fi corelate cu fixarea tisulară a RFOT-^{99m}Tc.

9.4.4.3. **Ţesuturi în curs de infarctizare.** Descoperirea faptului că RFOT-^{99m}Tc şi în special ^{99m}Tc-PP$_1$ prezintă un tropism accentuat pentru celulele miocardice în curs de infarctizare, a deschis un nou capitol în vizualizarea de emisie a miocardului. Pe plan fiziopatologic fenomenul are semnificaţie mai generală întrucît concentrarea ^{99m}Tc-PP$_1$ a fost semnalată şi în alte ţesuturi ce-şi pierd viabilitatea; pe un model de necroză în culturi celulare s-a demonstrat că celulele necrozate acumulează ^{99m}Tc-HEDP şi ^{99m}Tc-PP$_1$ de 15—20 de ori mai mult decît celulele vii [37]. Concentrarea RFOT-^{99m}Tc în ţesuturile pe cale de necrozare este explicată prin creşterea influxului intracelular al calciului la nivelul zonelor în curs de infarctizare.

9.4.4.4. **Alte condiţii însoţite de acumularea RFOT-^{99m}Tc în ţesuturile moi.** Printre cauzele de concentrare extrascheletică a radiofarmaceuticelor osteotrope se citează polimiozitele, dermatomiozitele, amiloidoza, localizările splenice ale bolii Hodgkin, injecţiile locale de produse terapeutice ale fierului, ca şi afecţiuni renale (fig. 9.2).

9.4.5. TOXICITATE. EFECTE SECUNDARE

Experienţa cîştigată în terapeutica clinică a afecţiunilor osoase cu difosfonat a permis de la bun început cunoaşterea faptului că doza trasor de ^{99m}Tc-HEDP este mult mai mică decît cantităţile ce produc efecte

Scanned with OKEN Scanner

toxice. Pentru PP_x DL_{50} la rozătoare este de 100 mg/kg corp [3]. Pentru MDP şi HEDP DL_{50} acută la rozătoare, după injectarea i.v., este de 45—50 mg/kg corp [19]. Pentru PP_1 s-a determinat DL_{50} de 29 ± 2 mg/kg corp la şobolan [38]. Mecanismul toxicităţii PP_x şi PP_1 a fost detaliat prin încercarea de a corela dozele administrate cu efectele asupra concentraţiei calciului seric şi presiunii arteriale a CO_2(Pa CO_2). Pentru PP_1 modificările electrocardiografice hipocalcemice pot fi sesizate la doze de 12 mg/kg corp ; spectroscopia de absorbţie atomică sesizează scăderi ale concentraţiei calciului seric ionizat începînd cu doza de 20 mg/kg corp ; tetania devine evidentă la doze de 22 mg/kg corp [38]. Datele de toxicologie experimentală fundamentează lipsa de nocivitate a cantităţilor de polifosfaţi sau difosfonaţi utilizate în medicina nucleară ; între dozele toxice la animal şi cele utilizate diagnostic se plasează o zonă largă de securitate.

Verificările clinice efectuate [26] demonstrează că injectarea intravenoasă la om a dozelor diagnostice de ^{99m}Tc-PP_1 şi ^{99m}Tc-PP_x nu produce nici un efect semnificativ asupra valorilor serice ale fosfaţilor anorganici, proteinelor totale sau fosfatazei alcaline. Calciul ionizabil înregistrează scăderi medii nesemnificative statistic. Alte studii ce urmăresc eventualele efecte secundare biochimice ale HEDP injectat în doze de 5 mg/24 de ore timp de 7 zile consecutiv nu semnalează nici o modificare a parametrilor fosfocalcici explorati şi conchid asupra inocuităţii produsului, care în scop diagnostic este utilizat în doze de 10 ori mai mici şi în administrări unice [23].

Atît datele sus-menţionate cît mai ales experienţa căpătată pe plan mondial prin investigarea a zeci de mii de cazuri demonstrează lipsa nocivităţii şi a efectelor secundare după administrarea diagnostică a RFOT-^{99m}Tc.

9.5. CRITERII DE PRESCRIPŢIE A RADIOFARMACEUTICELOR OSTEOTROPE

Principala utilizare medicală a PRF osteotrope este vizualizarea scheletică de emisie, realizată cu ajutorul scintigrafului liniar sau camerei de scintilaţie. În prescrierea acestor PRF se pot lua în consideraţie o serie de criterii, pe care, pentru considerente practice, le prezentăm schematizate în tabelele 9.3 — 9.6.

Prescripţia diferenţială a PRF osteotrope este dictată în mai mică măsură de scopul investigaţiei scintigrafice cît mai ales de elementele ce ţin de criteriile radiobiologice, economico-organizatorice şi de tehnologia vizualizării.

Stronţiul-85 prin costul redus şi accesibilitatea sa mai este utilizat de laboratoarele mici, cu interes întîmplător în investigarea osoasă. Iradierea crescută ca şi calitatea slabă a imaginilor rezultînd din fluxul redus de fotoni la activităţile posibil administrabile fac din ^{85}Sr un PRF cu utilizare din ce în ce mai rară în medicina nucleară.

Fluorul-18 este produsul cu cele mai avantajoase caracteristici farmacocinetice (raport os patologic/os normal şi os normal/părţi moi excelent, înaltă specificitate osoasă). Ceea ce îi limitează utilizarea este energia fotonilor, nepotrivită cu specificaţiile camerei de scintilaţie, costul ridicat al produsului şi mai ales procurarea dificilă. ^{18}F este utilizat în prezent de instituţiile cu interes deosebit pentru investigarea metabolică

TABELA 9.3

Criterii farmacocinetice de prescripție a radiofarmaceuticelor osteotrope în vizualizarea osoasă

	Clearance sanguin	Clearance urinar	Osteotropism	Raport os / părți moi	Specificitate etiologică	Factori perturbatori în vizualizarea osoasă
^{85}Sr	lent	lent	marcat	Valoare crescută 48—72 ore de la administrare	absentă	eliminare digestivă
^{87m}Sr	lent	lent	marcat	Valoare scăzută; impune substracția fondului tisular	absentă	eliminare digestivă
^{18}F	rapid	rapid	marcat	crescut	absentă	vezica urinară
RFOT-^{99m}Tc	rapid	rapid	marcat	crescut	absentă	vezica urinară

TABELA 9.4

Criterii radiobiologice. Iradierea comparativă produsă de diferite radiofarmaceutice utilizate în scintigrafia osoasă

(rem/mCi)

Radiofarmaceutic și cota bibliografică	Întreg corp	Schelet	Măduva osoasă	Gonade	Vezica urinară
^{85}Sr clorură [48]	5—10	30—50	10	1—3	—
[15]	4,2	36	11	—	—
^{87m}Sr clorură [48]	0,01—0,02	0,1—0,15	0,02	—	—
[15]	0,02	0,08	0,1	—	—
^{18}F [48]	0,05—0,1	0,1—0,3	0,04	0,04—0,07	2—5
[15]	0,04	0,15	0,04	—	—
^{99m}Tc-polifosfat [48]	0,01	0,05—0,07	0,01	0,02	0,1—0.2
[19]	0,01	0,054	0,038	0,014—0,02	0,32
^{99m}Tc-difosfonat [19]	0,007	0,038	0,025	0,012—0,017	0,44

TABELA 9.5

Criterii tehnologice de vizualizare pentru radiofarmaceutice osteotrope

	Energia radiației față de specificațiile aparaturii de vizualizare		Flux de fotoni la dozele uzuale administrate	Durata investigației	Posibilitatea repetării		Iradierea personalului
	Scintigraf liniar	Camera de scintilație			cu aceeași doză	cu altă doză	
^{85}Sr	adecvată	adecvată	redus	prelungită	da	nu	redusă
^{87m}Sr	adecvată	adecvată	intens	redusă	nu	da	apreciabilă
^{18}F	necesită colimator adecvat	neadecvată	intens	redusă	nu	da	apreciabilă
RFOT-^{99m}Tc	adecvată	ideală	intens	redusă	nu	da	apreciabilă

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 9.6

Criterii organizatorice și economice pentru utilizarea unor radiofarmaceutice osteotrope

	Procurare	Cost	Condiționarea produsului livrat	Tehnologia preparare și administrare	Stocare în laborator	Alte utilizări ale produsului final
^{85}Stronțiu	ușor procurabil din surse comerciale	redus	flacon multidoză	injectare i.v.	1—2 luni	nu
^{87m}Stronțiu	ușor procurabil din surse comerciale	ridicat	generator steril	eluare generator injectare i.v.	10—14 zile (generator)	investigări hemodinamice
^{18}Fluor	dificilă	foarte ridicat	flacon multidoză	injectare i.v. sau administrare orală	minute	nu
RFOT-^{99m}Tc	ușor procurabil din surse comerciale	moderat	generator steril truse de preparare	— Eluare generator — preparare produs final — injectare i.v.	10—14 zile (generator) 4—8 ore (produs final)	vizualizare miocardică (produs final) vizualizare tiroidiană, cerebrală, articulară (generator-pertechnetat)

Scanned with OKEN Scanner

și scintigrafică osoasă, care dispun de instalații proprii de producere a ^{18}F sau au acces la asemenea instalații aflate în imediata lor apropiere.

Radiofarmaceuticele osteotrope marcate cu ^{99m}Tc — anunță din punct de vedere practic introducerea vizualizării osoasă în investigația de medicină nucleară contemporană. Dintre multiplele produse propuse preferințele prezente se îndreaptă către HEDP, MDP, și PP_1 date fiind avantajele lor farmacocinetice. RFOT-^{99m}Tc sînt dezavantajate de lipsa specificității lezionale ca și de prezența radioactivității vezicale urinare, care împiedică vizualizarea sacrului.

9.6. INDICAȚIILE ACTUALE ALE SCINTIGRAFIEI OSOASE

9.6.1. TUMORI MALIGNE

9.6.1.1. Diagnosticul și urmărirea tumorilor maligne cu potențial de metastazare osoasă. Investigarea corectă a unor tumori maligne cunoscute pentru potențialul lor de metastazare osoasă (în ordinea frecvenței în special cancerul de sîn și cancerul de prostată) impune și efectuarea obligatorie a scintigrafiei osoase de întregul corp, în vederea detectării precoce a eventualelor localizări secundare scheletice [15, 39, 40, 41].

Publicațiile ultimilor ani demonstrează că scintigrafia și radiografia osoasă sînt examene complementare în investigarea oncologică osoasă dar că scintigrafia osoasă este superioară ca sensibilitate în detectarea precoce a metastazărilor scheletice.

În tabela 9.7 sînt sintetizate rezultatele cercetărilor efectuate pe 5 grupe de pacienți, în perioada 1972—1975, în vederea stabilirii sensibilității comparative a vizualizării osoase de emisie și de transmisie în detecția metastazelor osoase [42, 43, 44].

TABELA 9.7

Valoarea comparativă a radiografiei și scintigrafiei osoase în detectarea metastazelor scheletice

Anul publicației	Bibliografie	Nr. cazuri	Scintigrafie / Radiografie	+ / +	+ / −	− / +	− / −
1972	De Nardo (citat [42])	879		33 %	15 %	2%	50 %
1974	Citrin [20]	164		35 %	26 %	0	39 %
1974	Muray [42]	467		32 %	33 %	2 %	33 %
1975	Pistenma [43]	200		26 %	28,5 %	1,5 %	38 %
1975	Fletcher [44]	146		23,2 %	19 %	2,8 %	45 %

Rezultă că scintigrafia osoasă reușește să detecteze existența metastazelor în 15—30% din cazurile în care examenul radiologic este normal. Explicația este dată de faptul că vizualizarea de emisie obiectivează chiar procesul de remaniere metabolică osoasă, în timp ce vizualizarea de transmisie reflectă numai rezultantele acestuia în termenii modificării gradului de mineralizare osoasă. Adesea metastazele osoase detectate numai scintigrafic sînt confirmate și radiologic după 6—8 luni de evoluție.

În opinia noastră scintigrafia osoasă — integrată tuturor datelor clinice, radiologice și de laborator — își justifică indicația în investigarea

Scanned with OKEN Scanner

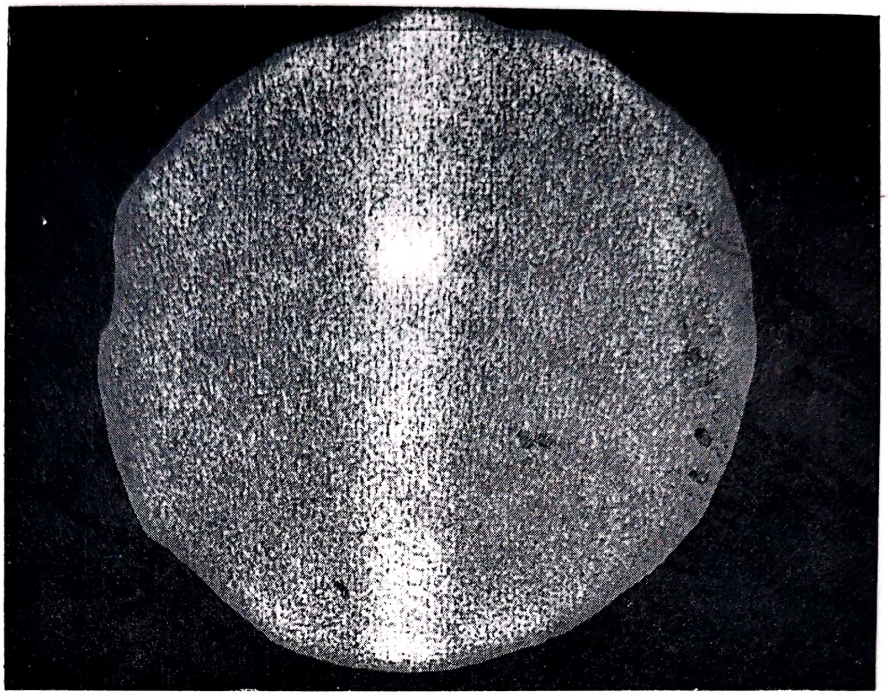


Fig. 9.1. — ^{99m}Tc-difosfonatul în vizualizarea tumorilor osoase; metastazare vertebrală după adenocarcinom mamar. Raport de fixare a PRF:

$$\frac{\text{os patologic}}{\text{os normal}} = \frac{3,2}{1.}$$

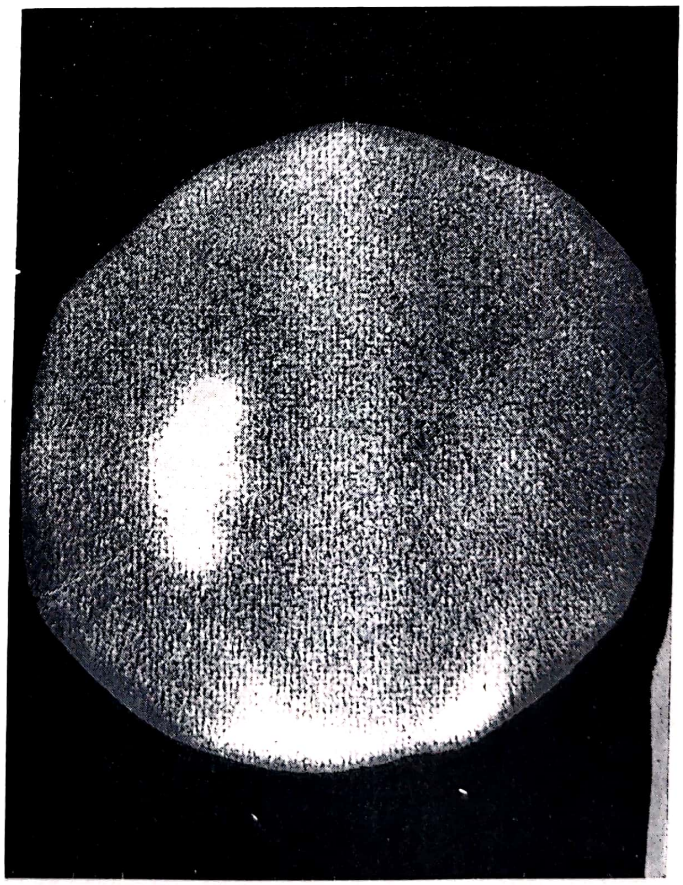


Fig.9.2. — Fixarea extra-osoasă a RFOT-^{99m}Tc; acumulare renală stg. net crescută prin proces tumoral malign.

de rutină a bolnavilor suferinzi de tumori maligne cu potențial metastazant osos deoarece permite pe plan diagnostic : depistarea precoce a metastazelor osoase mute din punct de vedere radiologic și clinic ; stabilirea gradului real de diseminare și extensie scheletică în cazul metastazelor osoase cunoscute ; confirmarea sau infirmarea substratului osos al unor acuze subiective a căror cauză nu este stabilită ; argumentarea diagnosticului diferențial în unele fracturi patologice ; ghidajul precis al clinicianului în efectuarea unor prelevări osoase bioptice necesare stabilirii tipului histologic de tumoră secundară.

Pe plan terapeutic datele furnizate de scintigrafia osoasă (efectuată cel mai adesea secvențial) permit stadializarea afecțiunii și stabilirea în consecință a terapeuticii : urmărirea mai exactă a evoluției sub tratament.

9.6.1.2. **Diagnosticul și urmărirea tumorilor maligne primitive osoase.** Radiofarmaceuticele osteotrope sînt utile atît pe plan diagnostic, cît și pentru urmărirea eficienței terapiei.

Pe plan *diagnostic* scintigrafia osoasă permite :

— stabilirea mai exactă a limitelor locale ale procesului tumoral, ce sînt de obicei mai extinse decît limitele indicate de radiografia osoasă ; decalarea metastazelor cu potențial, de calcifiere (în special metastazele pulmonare ale osteosarcoamelor) ; diagnosticul diferențial al fracturilor patologice.

Pe plan terapeutic scintigrafia osoasă ajută la : aprecierea zonei de securitate în efectuarea intervențiilor conservatoare de exereză ; aprecierea eficienței radioterapiei cu normalizarea imaginii în decurs de cîteva luni la cazurile cu evoluție favorabilă ; detecția precoce a recidivelor locale după tratament chirurgical sau radioterapie.

9.6.2. AFECȚIUNI OSOASE BENIGNE

Radiofarmaceuticele utilizate în investigația osoasă au un înalt grad de nespecificitate în fixarea pe țesutul osos patologic [40, 41].

Aceasta explică prezența hiperfixării PRF osteotrope într-o serie largă de condiții patologice, indiferent de substratul lor lezional, fapt ce conferă scintigrafiei osoase caracterul de nespecificitate etiologică.

În cadrul afecțiunilor osoase benigne PRF osteotrope sînt utilizate pentru vizualizarea de emisie în următoarele grupe de afecțiuni :

— tumori osoase benigne,
— inflamații osoase acute și cronice [45],
— afecțiuni osoase traumatice [46],
— afecțiuni osoase distrofice și endocrino-metabolice [29, 31, 49],
— afecțiuni reumatismale [47].

În încheiere menționăm faptul că scintigrafia osoasă cu RFOT-^{99m}Tc este indicată chiar și în explorarea pediatrică, întrucît valoarea informațiilor diagnostice obținute depășește ponderea redusă a eventualului risc radiobiologic [45, 50].

BIBLIOGRAFIE

1. G.C.H. Bauer, B. Wendeberg, *J. Bone Joint Surg.*, **41B**, 338 (1959).
2. V.R. Mc Cready, J.R. French, M.M. Gwyther, în „Radioisotope in der Lokalisationsdiagnostik", F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1967, p. 407.
3. G. Subramanian, J.C. Mc Afee, *Radiology*, **99**, 192 (1971).

Scanned with OKEN Scanner

4. D.A. Weber, E.J. Greenberg și colab., *J. Nucl. Med.*, **10**, 8 (1969).
5. J.M. Vaughan, „The physiology of bone", Clarendon Press, Oxford, 1970.
6. N.D. Charkes, I. Young, D. Sklaroff, *J.A.M.A.*, **206**, 2482 (1968).
7. N.D. Charkes, „Bone scanning" în Bland W.H. „Nuclear Medicine", Mc Graw Hill Book Comp., New York, 1971.
8. L.D. Samuels, *Amer. J. Roentgenal. Radium Ther. Nucl. Med.*, **115**, 777 (1972).
9. K.T. Chaudhuri, *J. Nucl. Med.*, **15**, 825 (1974).
10. G.T. Krishnamurthy, B.T. Panchita și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 832 (1974).
11. D. Van Dyke, H. Anger și colab., *J. Nucl. Med.*, **12**, 506 (1971).
12. D. Van Dyke, H.O. Anger, Y. Yano, *Amer. J. Physiol.*, **209**, 65 (1965).
13. H. Fleisch, „Pyrophosphat und Diphosphonate", în „III Jenaer Harnsteinsymposium", p. 84, Frederich Schiller Universität, Jena, 1973.
14. R. Perez, Y. Cohen, R. Henry, *J. Nucl. Med.*, **13**, 788 (1972).
15. R.O. O'Mara, N.D. Charkes, „The osseous system", în „Clinical Scintillation Imaging", ed. a II-a, Grune and Straton, New York, 1975, p. 537.
16. Gh. Georgescu, A. Constantinovici, Consfătuirea „Valoarea și limitele examenului radiologic în explorarea afecțiunilor scheletului", p. 14, București, 1976.
17. * * * Editorial, *J. Nucl. Med.*, **16**, 1 (1975).
18. F.P. Castronovo, M.S. Potsaid, *J. Nucl. Med.*, **18**, 855 (1977).
19. G. Subramanian, J.G. Mc Afee, R.J. Blair, *J. Nucl. Med.*, **16**, 744 (1975).
20. G. Subramanian, J. G. Mc Afee și colab, „Medical radionuclide imaging", vol. 2, p. 83, IAEA, Vienna, 1977.
21. D.L. Citrin, „Proc. First World Congress Nucl. Med. ", p. 201, Tokyo, 1974.
22. D.L. Citrin, R.G. Bessent și colab., *Br. J. Radiol.*, **48**, 118 (1975).
23. D.L. Citrin, R.G. Bessent și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 886 (1975).
24. D.L. Citrin, *J. Nucl. Med.*, **17**, 417 (1976).
25. G.T. Krishnamurthy, M. Tubis, J.S. Endow, *J. Nucl. Med.*, **15**, 848 (1974).
26. G.T. Krishnamurthy, R.J. Huebotter, C.F. Walsh, *J. Nucl. Med.*, **16**, 109 (1975).
27. A.D. Garcia, D.E. Tow și colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 2 (1976).
28. A.M. Zimmer, T.A. Isitman, A.R. Holmes, *J. Nucl. Med.*, **16**, 352 (1975).
29. L. Rosenthall, M. Kaye, *J. Nucl. Med.*, **16**, 33 (1975).
30. M. Kaye, S. Silverston, L. Rosenthall, *J. Nucl. Med.*,, **16**, 40 (1975).
31. T. Wiegmann, J. Kirsch și colab., *J. Nucl. Med.*, **17**, 711 (1976).
32. C.S.B. Galasko, „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, p. 125, IAEA, Vienna, 1977.
33. G. Subramanian, J.G. Mc Afee și colab., în „Radiopharmaceuticals", Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p. 313.
34. G.R. Berg, J. Kalisher și colab., *Radiology*, **109**, 393 (1973).
35. M.E. Siegel, B.H. Friedman, H.N. Wagner jr., *J.A.M.A.*, **229**, 1769 (1974).
36. T.K. Chaudhuri, H.J. Cristie, *J. Nucl. Med.*, **15**, 458 (1974).
37. M.K. Dewanjee, *J. Nucl. Med.*, **17**, 993 (1976).
38. S.J. Stevenson, C.W. Eckelman și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 252 (1974).
39. S. Bakshi, R.E. Ackerhalt, M. Blau, *Cancer Bull.*, **112**, 25 (1973).
40. B. Bok, J. Rondier, S. Timet, *Path. Biol.*, **22**, 231 (1974).
41. B. Lahneche, „Squelette" în „Médecine Nucléaire", vol. 2, Ed. Flammarion, Paris, 1975, p. 289.
42. I.P.C. Murray, „Proc. First World Congr. Nucl. Med., " Tokyo—Kyoto, 1974, p. 208.
43. D.A. Pistenna, I.R. Mc Dougall, J.P. Kriss, *J.A.M.A.*, **231**, 46 (1975).
44. J.W. Fletscher, E. Solario George și colab., *Arch. Intern. Med.*, **135**, 553 (1975).
45. S. Treves, J. Khettry și colab., *Pediatrics*, **57**, 173 (1976).
46. E.W. Fordham, P.C. Ramachandran, *Sem. Nucl. Med.*, **4**, 430 (1974).
47. P. Pfannenstiel, H.V. Pixberg și colab., „Proc. First World Congr. Nucl. Med.", p. 218, Tokyo (1974).
48. G.J. Hine, J.A. Sorenson, „Instrumentation in Nuclear Medicine", vol. 2, Academic Press, New York, 1974.
49. G.T. Krishnamurthy, A.S. Brickman și colab., „Medical Radionuclide Imaging", vol. 2, p. 119, IAEA, Vienna, 1977.
50. H.T. Harcke, *J. Nucl. Med.*, **19**, 324 (1978).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10

UTILIZAREA RADIOFARMACEUTICELOR ÎN INVESTIGAREA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

DE

Conf. Dr. A. CONSTANTINOVICI

Una dintre achiziţiile cele mai importante realizate în cursul ultimilor ani în domeniul investigaţiilor sistemului nervos central îl reprezintă desigur studiile radioizotopice îmbrăcînd atît modalitatea lor statică cît şi cea dinamică [1—7]. Spectrul radiofarmaceuticelor utilizate actualmente în investigarea sistemului nervos este diferit de cele utilizate cu cîţiva ani înainte. Astfel se explică înlocuirea practic completă a ^{131}I-albuminei, ^{203}Hg-clormerodrinului şi chiar a ^{197}Hg-clormerodrinului în marea majoritate a investigaţiilor cerebrale cu diverse PRF marcate cu ^{99m}Tc sau ^{113m}In. În domeniul investigării spaţiilor lichidiene şi a migrării lichidului cerebrospinal evoluţia preferinţelor a fost similară, locul ^{131}I-RISA fiind luat aproape complet de către produsele marcate cu ^{99m}Tc, ^{169}Yb şi în ultimii ani tot mai mult de către PRF marcate cu ^{111}In, ^{203}Pb produşi de ciclotron.

Avînd în vedere criteriile de preferinţă diferite pe care trebuie să le îndeplinească PRF în funcţie de specificul investigaţiei (statică sau dinamică — asupra fluxului sanguin sau lichidului cerebrospinal) şi analiza lor va fi făcută prin prisma acestor metode.

10.1. RADIOFARMACEUTICELE UTILIZATE ÎN STUDIILE STATICE CEREBRALE

Aproape în totalitatea lor PRF folosite în scintigrafia cerebrală îşi bazează acţiunea lor de vizualizare a zonei lezionale pe acumularea crescută a trasorului în zona lezională faţă de creierul normal adiacent. Acest lucru se explică atît prin gradul sporit al vascularizaţiei în numeroase procese patologice cerebrale (malformaţii vasculare, tumori hipervascularizate), cît în special prin alterarea barierei hemato-encefalice determinată de boală. Integritatea acestei bariere existentă în mod normal reprezintă obstacolul principal pentru difuzarea extravasculară a PRF, iar alterarea ei determină trecerea sporită extravasculară a trasorului [8] şi legarea eventuală a acestuia de conţinutul hiperproteic din regiunea lezională [9, 10]. Dacă acesta este comportamentul marei majorităţi a radionuclizilor utilizaţi actualmente în scintigrafia cerebrală, există şi unele studii care caută să ateste proprietatea unor radiofarmaceutice de tipul 4-^{77}Br-2,5-dimetoxifenil-izopropilamină (4-Br-DPIA) care s-ar fixa selectiv pe

Scanned with OKEN Scanner

creierul normal (compusul respectiv fiind un stimulent nervos), zonele patologice urmînd să apară ca zone hipoactive [11].

^{99m}Tc reprezintă astăzi în domeniul scintigrafiei cerebrale radionuclidul de elecţie pentru marea majoritate a cercetărilor [15]. La aceasta au contribuit numeroasele sale calităţi din care citäm numai pe cele mai importante :

— radiaţie gamma pură, monocromatică, de 140 keV uşor de colimat ;

— timp de înjumătăţire fizic convenabil pentru înregistrare (6 ore) ;

— clearance sanguin relativ scurt (6 ore) ;

— posibilitatea de obţinere la un cost rezonabil în laborator din generatorul de ^{99}Mo (cu $T_{1/2}$ fizic de 67 ore) ;

— o iradiere de organism destul de scăzută (0,2 rad) în comparaţie cu aceea a ^{131}I-serumalbuminei (0,75 rad) sau a ^{203}Hg-clormerodrinului (0,4 rad), pentru a nu mai menţiona iradierea organului critic de : 1—3 rad pentru colon la $^{99m}TcO_4$, 0,5 rad pentru sînge la ^{99m}Tc-HSA, 2,5 rad pentru sînge la ^{131}I-HSA, 165 rad pentru rinichi la ^{203}Hg-clormerodrin şi chiar aceea de 13—21 rad pentru rinichi a ^{197}Hg-clormerodrinului. Acest fapt permite repetabilitatea examenului cu TcO_4 fără pericol semnificativ de iradiere. La aceste calităţi vine să se adauge şi posibilitatea de complexare destul de uşoară cu diverşi agenţi chimici cum sînt : substanţe chelatoare (DTPA, EDTA), Fe-ascorbat, compuşi fosforici (pirofosfat, polifosfat, difosfonat) ş.a., a căror utilitate în diverse domenii particulare de investigare s-a dovedit deosebită. Cu toate acestea forma de bază, obţinută direct din generator, pertechnetatul ($^{99m}TcO_4^-$) reprezintă modalitatea cea mai larg utilizată a acestui radionuclid.

Deşi cei mai mulţi autori înclină să afirme difuziunea directă din arborele capilar tumoral cu bariera hemato-encefalică afectată drept calea principală de acumulare a trasorului în procesul patologic [16], pînă în prezent nu există nici o dovadă fermă a predominanţei acestui mecanism. Unii autori au afirmat chiar o fixare intracelulară a $^{99m}TcO_4^-$ demonstrînd-o autohistoradiografic [17, 18]. Desigur că o participare esenţială la fixarea diferenţiată a TcO_4^- în diversele leziuni cerebrale o are natura histopatologică a leziunii [19]. Este îndeobşte recunoscută afinitatea în ordine descrescătoare după cum urmează : meningioame, glioblastoame, neurinoame, oligodendroglioame, metastaze şi cel mai slab pentru astrocitoame la care procentul de vizualizare se situează în diversele statistici în jurul aceluia de 50%. O notă aparte o aduc procesele expansive cu caracter chistic. Astfel dacă pentru tumorile chistice la copii s-a afirmat o fixare în doi timpi, mai întîi în componenta tumorală şi abia apoi în conţinutul chistic [19, 20], atît în abcesele cerebrale cît şi în colecţiile sanguine trecerea radiotrasorului se face în cantitate foarte redusă, elementul vizualizabil scintigrafic constituindu-l de obicei membrana de înveliş la nivelul căreia au loc schimburi mai active ce determină existenţa unei zone congestive. Tot printr-o astfel de congestie se explică probabil şi vizualizarea ventriculilor la copii în prezenţa unor ventriculite [21] sau a unor leziuni de toxoplasmoză [22], precum şi a unor zone hipermetabolice la unii bolnavi cu episoade de comiţialitate [23] la care ulterior hiperactivitatea dispare. Mai dificilă devine interpretarea exactă a hiperactivităţii observate la unii bolnavi cu scleroză multiplă [24] sau a diferenţelor de activitate constatate la purtătorii de metastaze cerebrale, la care originea colică a acestora ar da

Scanned with OKEN Scanner

imagini mult mai fruste decît în cazul metastazelor cu punct de plecare pulmonar sau de la sîn [25].

O problemă îndelung dezbătută în literatura de specialitate a constituit-o aceea a găsirii drogului de elecţie pentru scăderea captării $^{99m}TcO_4^-$ în mucoasa oro-faringiană, la nivelul glandelor salivare precum şi la nivelul plexurilor choroide intraventriculare. S-au utilizat în acest sens atropina, percloratul de Na şi de K şi chiar şi soluţia de iodură de K. Din toate acestea percloratul atît de Na cît şi de K deţin locul principal [26, 27], discuţiile ducîndu-se în ultimul timp îndeosebi asupra diverselor căi de administrare [28] şi a intervalului de timp cu care trebuie administrat înainte de injectarea pertechnetatului [29, 30]. În general, se admite ca suficientă o doză de circa 400 mg perclorat administrat per os sau intrarectal cu circa 10—20 min înainte de administrarea PRF sau eventual intravenos concomitent cu pertechnetatul.

În acelaşi sens s-a utilizat şi glicopirolatul, un anticolinergic de sinteză, în doză de 0,2 mg administrat intravenos cu 20 min înainte de pertechnetat [31].

O altă serie de studii au căutat să elucideze mecanismul care să explice scăderea gradului de fixare a pertechnetatului de către formaţiunile tumorale cerebrale în urma administrării de steroizi [32, 33] fixare care revine la normal după cîteva zile de pauză. În acest sens se pare că steroizii ar acţiona prin scăderea edemului peritumoral ceea ce atrage după sine scăderea fixării pertechnetatului [19, 34].

Forma conjugată de administrare a ^{99m}Tc. Tot în sensul găsirii unor derivaţi marcaţi cu ^{99m}Tc care să dea o fixare superioară celei a pertechnetatului se înscriu şi studiile închinate utilizării unor forme conjugate.

Astfel, o primă serie de studii [35, 36] a urmărit rezultatele obţinute *cu ^{99m}Tc-DTPA*, înregistrările scintigrafice făcîndu-se la diverse intervale. Rezultatele au apărut autorilor ca superioare faţă de cele făcute cu pertechnetat cu deosebire în înregistrările tardive (3—4 ore), la bolnavii cu encefalite şi la cei cu infarcte cerebrale. Dimpotrivă, în alte studii sînt subliniate calităţile complexului cu DTPA în special pentru determinările precoce (Mc Afee şi Subramanian în [5]).

De asemenea apare ca promiţător în înregistrările tardive şi *^{99m}Tc-glucoheptonatul*, cu rezerva pentru costul ridicat al produsului şi necesitatea unui timp de înregistrare prelungit [37].

În cazul utilizării ambelor forme conjugate sus-citate cît şi a altora (^{99m}Tc-Fe ascorbat sau ^{99m}Tc-albumină umană) trebuie menţionat şi faptul că nu este necesară administrarea prealabilă de perclorat pentru inhibarea stocării radionuclidului în glandele salivare sau tiroidă [10, 12].

De un interes deosebit se bucură actualmente şi în domeniul investigaţiilor scintigrafice cerebrale utilizarea complecşilor *^{99m}Tc cu compuşi fosforici* de tipul pirofosfatului, polifosfatului, difosfonatului. Această vizualizare crescută nu priveşte numai tumorile cu componentă hiperostotică importantă cum sînt meningioamele aripei de sfenoid [38], sau bolile cu interesare difuză a calotei—boala Paget [29], ci şi procesele patologice cerebrale cu componentă ischemic-necrotică importantă [40, 41, 42]. Această fixare crescută a complecşilor fosforici pare a fi guvernată de prezenţa ionilor de Ca şi PO_4 în ţesutul infarctizat care reproduce chiar o structură apropiată de aceea a matricei minerale osoase.

În afara interesului în sine pentru vizualizarea zonelor ischemice cerebrale, administrarea succesivă a ^{99m}Tc sub diverse forme radiofarma-

Scanned with OKEN Scanner

ceutice ($^{99m}TcO_4$, ^{99m}Tc-DTPA, ^{99m}Tc-citrat şi, în fine, ^{99m}Tc-pirofosfat sau difosfonat) ar putea servi şi la stabilirea naturii leziunii [44], formele citrat şi DTPA fiind superioare în prezenţa tumorilor. Acest avantaj trebuie însă pus desigur în balanţă şi cu iradierea crescută impusă de acest procedeu. De asemenea trebuie ţinut seama şi de faptul că administrînd prealabil pirofosfat, administrarea ulterioară de pertechnetat realizează imagini cu contrast mult mai slab în prezenţa unei tumori decît dacă se administrează pertechnetatul de la început [45]. Acest defect nu se observă însă dacă în prealabil s-a administrat ^{99m}Tc sub forma conjugată cu DTPA.

Aşa cum reiese din cele expuse, avantajele deosebite prezentate de ^{99m}Tc îl fac să fie radionuclidul cel mai larg utilizat în scintigrafia cerebrală. Posibilitatea obţinerii uşoare a formelor sale conjugate de asemenea a permis larga diversificare a formelor sale de administrare în funcţie de specificul lezional de investigat. Aceste calităţi ale ^{99m}Tc şi în special al pertechnetatului nu l-au scutit însă de unele critici asupra performanţelor lui, critici elaborate îndeosebi pe baza unor studii experimentale [46]. Compararea fixării sale cu aceea a unei serii de alţi produşi, şi îndeosebi a unor produşi de ciclotron cum sînt ^{111}In, ^{67}Ga, dă unele rezultate ce par a favoriza pe aceştia din urmă. Trebuie însă ţinut seama atît de dificultăţile de aprovizionare ritmică cu aceşti produşi, cît şi de faptul că datele obţinute pe tumorile experimentale induse la şoareci nu sînt total superpozabile cu acelea înregistrate în patologia umană. În baza acestor studii ar reieşi că ^{111}In, în special sub formă de clorură (pH = 1,5), ar prezenta avantaje maxime din punctul de vedere al fixării tumorale.

Un alt radionuclid de viaţă scurtă posibil de obţinut dintr-un generator de laborator de la care s-au aşteptat rezultate bune în scintigrafia cerebrală l-a constituit ^{113m}In. Existenţa unei radiaţii gamma monocromatice de 392 keV a părut, cel puţin din punct de vedere teoretic, mai promiţătoare decît aceea de 140 keV a ^{99m}Tc, or, tocmai energia aceasta mai mare dezavantajează înregistrarea cu ajutorul camerei de scintilaţie [47, 48]. În orice caz pentru obţinerea unor imagini semnificative ^{113m}In obţinut sub formă de clorură din generatorul de ^{113}Sn trebuie neapărat administrat sub forma conjugată cu DTPA [49]. Calitatea mai slabă comparativ a imaginilor faţă de acelea obţinute cu ajutorul ^{99m}Tc, chiar în forma direct eluată a acestuia (ca pertechnetat), nu-şi găseşte contrabalansarea decît în faptul că generatorul de ^{113}Sn are o durată de exploatare mai lungă decît acela de ^{99m}Mo. Totodată însă trebuie avut în vedere şi faptul că aceste generatoare de indiu livrabile actualmente, au o capacitate limitată la 50 mCi, ceea ce nu poate asigura decît maximum 4—5 scintigrafii la o eluare în perioada iniţială. La acest dezavantaj vin să se adauge şi costurile iniţial ridicate al generatorului de ^{113}Sn, costuri care pot fi amortizate doar printr-o utilizare îndelungată a lui şi prin eluări repetate zilnice. Indiferent de forma chimică de administrare, mecanismul de pătrundere în masa tumorală este acela de difuziune [49].

^{169}Yb reprezintă un alt radionuclid produs la reactor cu un timp de înjumătăţire fizic destul de convenabil (31 zile) ca asigurare a funcţionalităţii laboratorului, dar care-i determină o iradiere destul de ridicată pentru dozele necesare unei scintigrafii cerebrale (15 mCi). Administrarea se face sub formă chelată cu DTPA utilizîndu-se îndeosebi pentru studiile dinamicii lichidului cerebrospinal aşa cum vom arăta la capitolul respectiv. Pentru evidenţierea comparativă a avantajelor şi dezavantajelor legate de

Scanned with OKEN Scanner

diverse PRF utilizate mai mult în scintigrafia cerebrală reproducem tabela 10.1 după O'Mara și Mozley (1971), modificată de Heck și colab. [10].

TABELA 10.1

Radiofarmaceuticul	Posologia uzuală	$T_{1/2}$ fizic	Energia gamma principală keV	Doza de irad. rad	
				organism	organ critic
^{131}I-serumalbumină	375 μCi	8,1 d	364	0,75	2,5 (singe)
^{203}Hg-clormerodrin	750 μCi	47,9 d	279	0,4	165 (rinichi)
^{197}Hg-clormerodrin	750 μCi	2,7 d	77	0,09	13—21 (rinichi)
^{113}In-DTPA	10—20 mCi	1,7 h	390	0,1	2,5—5 (vezică)
^{169}Yb-DTPA	15mCi	31 d	117+198	0,3	4,5 (vezică)
$^{99m}TcO_4$	10—20mCi	6 h	140	0,2	1—3 (colon)

Reiese net diferența de iradiere îndeosebi pentru organul critic care a determinat înclinarea preferințelor cercetătorilor tot mai mult către ultimii radionuclizi.

Utilizarea *pozitroemițătorilor*, destul de larg răspîndită în numeroase centre cu cîțiva ani în urmă, a înregistrat un recul destul de important îndeosebi în ceea ce privește pozitroemițătorii cu $T_{1/2}$ mai lung (^{74}As, ^{64}Cu). Acest lucru s-a extins chiar și în ceea ce privește utilizarea ^{18}F, radionuclid de viață destul de scurtă. Un oarecare interes l-au mai suscitat în schimb unii pozitroemițători de viață mai scurtă, cea mai mare parte produși, în ciclotron (^{13}N, $^{15}O_2$), care au servit îndeosebi unor cercetări asupra metabolismului cerebral [60]. Pînă în prezent însă, utilizarea lor nu s-a extins.

În concluzie se poate desprinde faptul că în absența unor radionuclizi cu tropism selectiv pentru procesele patologice ale sistemului nervos central, investigarea radioizotopică statică a acestora recurge în continuare la PRF uzuale în scintigrafia curentă a restului organelor, preferințele fiind dictate de obicei de celelalte considerente decît cele specifice cerebrale: considerente fizice, economice, cele legate de iradierea organismului și a organului critic, de performanțele aparaturii de înregistrare avută la dispoziție etc. În ciuda numeroaselor cercetări efectuate, pe primul plan continuă să se situeze astfel diversele radiofarmaceutice marcate cu ^{99m}Tc și în principal pertechnetatul. Un cuvînt merită poate însă să fie spus și despre oportunitatea utilizării în continuare a unor diuretice mercuriale de tipul clormerodrinului (Neohydrin) marcate cu ^{197}Hg sau cu ^{203}Hg în scintigrafia cerebrală. Odată cu căderea în desuetudine a ^{203}Hg (datorită importantei iradieri de organ critic pe care o determină) și utilizarea diureticelor marcate cu ^{197}Hg a înregistrat o scădere. Acest fapt își găsește explicația în mai multe cauze: caracterul prea slab al energiei radiației gamma emise (77 keV), un timp de înjumătățire fizic prea scurt (2,7 zile) pentru condițiile de aprovizionare de la reactoare cît și menținerea unei iradieri destul de puternice pentru rinichi (13—21 rad), fără a mai aminti de necesitatea saturării prealabile a rinichiului cu un diuretic mercurial neradioactiv, ceea ce întîrzie cu 24 ore posibilitatea practicării examenului scintigrafic cerebral.

10.2. STUDIILE DINAMICE ALE CIRCULAȚIEI SANGUINE CEREBRALE

Deși abordată de un deceniu, studierea circulației cerebrale cu ajutorul radiotrasorilor a cunoscut abia în ultimii ani o dezvoltare mai largă datorită perfecționării sistemelor de înregistrare a modificărilor circulatorii din diversele sectoare cerebrale. Dacă inițial aceste studii se refereau la modificările cantitative ale debitului sanguin regional [61, 62], în ultimii ani tot mai multe cercetări abordează aspectele secvențiale angioscintigrafice caracteristice unor modificări patologice dintre cele mai variate (procese ischemice, malformații arterio-venoase, tumori, revărsate sanguine etc. [1, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76].

În toate aceste studii și cercetări, PRF introdus ca „embolus" radioactiv în circulație l-a reprezentat un volum de pertechnetat cu o activitate specifică cît mai ridicată, astfel încît înregistrările secvențiale ale diverselor componente ale circulației cerebrale (arterială, arteriolară, capilară, venoasă) să dea imagini cît mai concludente. Determinările radiocirculografice sînt urmate imediat de practicarea unor determinări scintigrafice obișnuite.

Pentru efectuarea studiilor de debitmetrie cerebrală regională în locul ^{85}Kr utilizat inițial [61] sau a ^{131}I-antipirinei ca radiotrasor nedifuzabil, azi se utilizează aproape în exclusivitate ^{133}Xe administrat fie prin inhalare [76], fie cel mai adesea prin injectare intracarotidiană de soluție fiziologică în care este dizolvat radiotrasorul [77]. Același PRF a fost utilizat și pentru determinarea angioscintigrafică [78].

Unele cercetări recente au utilizat în același scop radiofarmaceutice marcate cu produsele de ciclotron $^{15}O_2$, $^{13}NH_3$, ^{11}C-*hemoglobină* [79, 80], reușind să diferențieze unele procese patologice hipervascularizate de cele hipovascularizate (infarcte).

10.3. RADIOFARMACEUTICE UTILIZATE ÎN STUDIILE DINAMICE ALE CIRCULAȚIEI LICHIDULUI CEREBROSPINAL (RADIOCISTERNOGRAFIE)

Studiul modului de producere și al dinamicii lichidului cerebrospinal (LCS) a înregistrat progrese deosebite prin aportul adus de determinările radioizotopice posibile de practicat prin metode nesîngerînde și aplicabile direct în patologia umană.

Criteriile pe care trebuie să le îndeplinească un PRF pentru a putea fi utilizat în aceste investigații sînt cele stabilite de Bell [81]: nemetabolizat în LCS, insolubil în lipide, cu clearance sanguin rapid, eliminabil în principal prin vilozitățile arahnoidiene, cu difuziune moleculară rapidă, neiritant, areactiv, neantigenic, ușor de marcat cu radionuclidul gamma emițător dorit, apirogenic, ușor de sterilizat.

Radiofarmaceuticele utilizate cel mai adeseori în prezent în aceste studii sînt cele din tabela 10.2 (modificat după James A.E. [82]).

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 10.2

Radionuclidul	Radiofarmaceuticul	Energia gamma keV	$T_{1/2}$	Posologia uzuală
^{131}I	Serum albumină	364	8,1 d	100 μCi
^{99m}Tc	,, ,,	140	6 h	1 mCi
^{169}Yb	DTPA	177—198	32 d	0,5 mCi
^{111}In	,,	172—247	2,8 d	0,5 mCi
^{67}Ga	,,	184—296	77,9 h	0,5 mCi

Dacă ^{131}I-serumalbumină PRF utilizat inițial de Di Chiro și colab. — 1964 — [83, 84] pierde din ce în ce mai mult din sufragiile cercetătorilor, în primul rînd din cauza fenomenelor iritante, de „meningită aseptică", pe care le produce datorită, se pare, nu atît albuminei în sine, cît prezenței unei endotoxine [85] și în egală măsură și datorită iradierii puternice a nevraxului, în special în blocajele spinale înalte [76], căutările pentru alte PRF cu performanțe tot mai bune sînt încă în plină desfășurare. Între radionuclizii cei mai utilizați se numără : ^{99m}Tc, ^{169}Yb, ^{111}In și ^{203}Pb. Compușii marcați cu ^{99m}Tc (sub forma chelată cu DTPA sau ca serumalbumină) deși realizează, datorită proprietăților fizice ale radionuclidului, o iradiere de aproximativ 5 ori mai mică decît aceea dată de compușii cu ^{169}Yb, ^{131}I și de 3 ori mai mică chiar decît aceea dată de ^{111}In-DTPA [9], prezintă ca dezavantaj major faptul că datorită $T_{1/2}$ fizic prea scurt, nu permite studiul de dinamică în cele 2 —3 zile ce urmează injectării radiofarmaceuticului. În cazul utilizării serumalbuminei marcate cu ^{99m}Tc se menține în plus și dezavantajul apariției reacțiilor adverse menționate mai sus și care, în unele statistici, ating chiar procente de 38% [85, 86].

Introducerea compușilor chelați de ^{169}Yb, de tipul DTPA [87] a rezolvat atît acest inconvenient al reacțiilor adverse [88] cît și acela al dezintegrării prea rapide a radionuclidului ; $T_{1/2}$ fizic de 32 zile al ^{169}Yb menține însă un grad înalt de iradiere a nevraxului, apropiat de acela dat de ^{131}I [89], la doza uzuală de 0,5 mCi. Totuși, în condițiile unei aprovizionări mai dificile a laboratoarelor, rămîne încă actualmente PRF de elecție deși unii autori îl consideră inferior serumalbuminei datorită difuzibilității sale mult mai mari decît aceea a albuminei [90].

Crearea unor posibilități de aprovizionare curentă a laboratoarelor cu produși de ciclotron a pus și la îndemîna investigațiilor radiocisternografice astfel de produși cum sînt ^{67}Ga, ^{111}In, ^{203}Pb, administrați sub forma lor chelată cu DTPA în doze de 0,5 mCi, produse care realizează iradieri medulare mult mai reduse. Datorită acestui fapt ei întrunesc în prezent din ce în ce mai mult preferințele cercetătorilor [91, 92, 93, 94, 95].

Indiferent de PRF utilizat, administrarea acestuia se face prin puncție în spațiile subarahnoidiene fie la nivel lombar, fie suboccipital. Apare ca importantă evitarea pe cît posibil a scurgerii extratecale a radiotrasorului. În acest sens practicarea așa-numitei cisternografii cu hiperpresiune controlată [96], pentru favorizarea scurgerii nazale eventuale a LCS, poate tocmai să determine o astfel de scurgere extratecală, ceea ce contraindică metoda și din acest punct de vedere [97].

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. * * * „Les Radioisotopes en Neuro-chirurgie. *Neuro-chir.*, **22**, 309 (1976).
2. J.H. Christie, H. Mori, R.T. Go, S.H. Cornell, *J. Nucl. Med.*, **17**, 552 (1976).
3. R.J. Jaszczack, P.H. Murphy și colab., *J. nucl. Med.*, **18**, 373 (1977).
4. M.A. Mikhael, A.G. Mattar, *J. Nucl. Med.*, **18**, 26 (1977).
5. J.G. Mc Afee, G. Subramanian, „Radioactive Agents for Imaging", în L.M.Freman, P.M. Johnson, „Clinical Scintillation Imaging", II-nd. ed., Ed. Grune & Stratton, New York, S. Francisco, London, 1975.
6. A. Constantinovici, „Tendințele actuale ale dezvoltării investigațiilor radioizotopice în procesele expansive intracraniene". Teză CUIR—IFA, București, 1964.
7. A. Constantinovici, A. Colea, „Investigațiile radioizotopice ale sistemului nervos", în C. Arseni și colab., „Investigații paraclinice în afecțiunile sistemului nervos", Edit. medicală, București, 1974.
8. D.M. Long, *J. Neurosurg.*, **32**, 127 (1970).
9. R.A. Holmes, E.V. Staab, „The central Nervous System" în L. Freeman, P.M. Johnson, „Clinical Scintillation Imaging", II-nd, ed., Ed. Grune & Stratton, New York, S. Francisco, London, 1975.
10. L.L. Heck, A. Gottschalk, P.B. Hoffer, „Static and Dynamic Brain Imaging", în A. Gottschalk, E.J. Potchen, „Diagnostic Nuclear Medicine", Ed. Williams Wilkins, Co., Baltimore, 1976.
11. III. Th. Sargent, D.A. Kalbhen, A.T. Shulgin și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 243 (1975).
12. G. Di Chiro, W.L. Asburn, A.S. Grove, *Neurology*, **18**, 225 (1968).
13. C.M.E. Matthews, G. Molinaro, *B.J. Exp. Pathol.*, **44**, 260 (1963).
14. D. Emrich, A. von zur Muhlen, F. Willgeroth și colab., *Acta Radiol. (Ther) (Stockh)*, **11**, 566 (1972).
15. H.J. Glenn, T.P Haynie, T. Konikowski, „Tumour localization, with Technetium-99m" în AIEA — Proc. of an advisory group meeting, Vienna, 1976.
16. C. Nahmias, C.E. Webber, M. Banna, E.S. Garnett, *J. Nucl. Med.*, **16**, 676 (1975).
17. S. Baum, *Radiology*, **99**, 153 (1971).
18. J.C. Kennady, R.A. Cole, M.L. Griswold și colab., *J. Nucl. Med.*, **10**, 349 (1969).
19. M.L. Schwartz, C.H. Tator, *J. Nucl. Med.*, **13**, 321 (1972).
20. D.L. Gilsay, *J. Nucl. Med.*, **15**, 494 (1974).
21. L.R. Fulmer, G.N. Sfakianakis, *J. Nucl. Med.*, **15**, 203 (1974).
22. S. Puri, R.P. Spencer, M.E. Gordon, *J. Nucl. Med.*, **15**, 641 (1974).
23. J.S. Stevens, F.S. Mishkin, *J. Nucl. Med.*, **16**, 573 (1975).
24. S.W. Miller, M.S. Potsaid, *J. Nucl. Med.*, **15**, 131 (1971).
25. W.H. Brooks, R.H. Mortara, D. Preston, *J. Nucl. Med.*, **15**, 620 (1974).
26. R.L. Witcofski, C.D. Maynard, T.J. Roper, *J. Nucl. Med.*, **8**, 187 (1967).
27. M.I. Muilenburg, *J. Nucl. Med.*, **15**, 221 (1974).
28. J.D. Scheu, M.R. Tetalman, O. Araujo, R.A. Sheriff, *J. Nucl. Med.*, **17**, 528 (1976).
29. N.P. Alazraki, R.L. Littenberg, S. Hurwitz și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 884 (1974).
30. D.A. Turner, A.A. Ali, M.G. Ochart și colab., *J. Nucl. Med.*, **18**, 258 (1977).
31. R.A. Holmes, C.N. Luth, *J. Nucl. Med.*, **16**, 819 (1975).
32. F.C. Stebner, *J. Nucl. Med.*, **16**, 320 (1975).
33. E.F. Crocker, R.A. Zimmerman, M.E. Phelps, *J. Nucl. Med.*, **17**, 528 (1976).
34. S.M. Pinsky, P.B. Hoffer, R. Flom și colab., *Radiology*, **98**, 672 (1971).
35. V. Broockeman, C.M. Williams, *J. Nucl. Med.*, **11**, 733 (1970).
36. R.S. Wolfstein, D.Tanasescu, I.T. Sakimura și colab., *J. Nucl. Med.*, **15**, 1135 (1974).
37. A.D. Waxman, D. Tanasescu, J.K. Siemsen, R.S. Wolfstein, *J. Nucl. Med.*, **17**, 345 (1976).
38. S.Mc Quade, H.P. Higgins, *J. Nucl. Med.*, **15**, 120 (1974).
39. K.F. Preimesberger, M.K. Loken, R.B. Shafer, *J. Nucl. Med.*, **15**, 880 (1974).
40. K.C. Fischer, K.A. Mc Kusick și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 705 (1975).
41. W.W. Wenzel, R.G. Heasty, *J. Nucl. Med.*, **15**, 207 (1974).
42. L. Penning, D. Front, M. Bechar și colab., *Brain*, **96**, 225 (1973).
43. E.B. Silberstein, M.D. Francis, A.J. Tofe, C.L. Slough, *J. Nucl. Med.*, **16**, 58 (1975).
44. M. Ectors, J. Abramovici, H.M. Jonskheer, *J. Nucl. Med.*, **16**, 526 (1975).
45. A.G. Walker, *J. Nucl. Med.*, **16**, 579 (1975).
46. T. Konikowski, M.F. Jahns și colab., *J. Nucl. Med.*, **16**, 200 (1975).
47. R.E. O'Mara, G. Subramanian, J.G. Mc Afee, *J. Nucl.* Med., **8**, 261 (1967).
48. A. Constantinovici, *Acta Radiol.*, **13**, 652 (1972).
49. H.J. Glenn, T.P. Haynie, T. Konikowski, „Tumour localization with radionuclides of Indium", în IAEA, Proc. of on adivisory group meeting, Vienna, 1976.
50. E.A. Jones, M. Koslow, G.S. Johnston, *J. Nucl. Med.*, **13**, 439 (1972).

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA A III-A

METODE DE ANALIZĂ *IN VITRO* FOLOSIND COMPUŞI MARCAŢI

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Odată cu descoperirea secreţiilor endocrine — hormonii — şi a importanţei lor în fiziologie şi în patologie s-a conturat o nouă discipină — endocrinologia — s-a restructurat şi se află în continuă prefacere întreaga gîndire medicală.

Pînă acum două decenii măsurarea concentraţiei hormonilor în lichidele biologice prezenta numeroase dificultăţi. Metodele biologice erau inexacte, puţin sensibile şi necesitau prelucrarea unor volume mari de sînge sau de urină. Hormonii steroizi puteau fi măsuraţi prin metode chimice suficient de exacte dar erau laboricase, necesitînd multiple trepte de purificare a lichidelor biologice. În anul 1960, Yalow şi Berson în Statele Unite, publică metoda de dozare radioimunologică a insulinei, iar Ekins în Anglia, metoda de analiză de saturare pentru dozarea tiroxinei. Ambele metode se bazează pe acelaşi principiu şi anume competiţia dintre substanţa marcată cu un izotop radioactiv şi substanţa nemarcată pe care o dozăm, pentru locurile de legare ale unei proteine : anticorp în cazul dozării radioimunologice a insulinei, proteină plasmatică în cazul dozării prin analiză de saturare a tiroxinei.

Sinteză a cunoştinţelor de chimie fizică şi a celor de chimie biologică şi de imunologie, noile metode îmbină sensibilitatea tehnicilor de radiochimie cu specificitatea anticorpilor sau a proteinelor de legare. A urmat o explozie de studii care au adus patru rezolvări importante :

1) măsurarea hormonilor polipeptidici în lichide biologice complexe neprelucrate, unde se află în concentraţii de 10^{-9} —10^{-12} g/ml (concentraţii de 10^{6} —10^{10} ori mai mici decît ale proteinelor plasmatice), noile metode întrecînd ca sensibilitate cu 4 —5 ordine de mărime metodele biologice ;

2) extinderea metodologiei de dozare şi la substanţe neantigenice ca hormonii steroizi, unele medicamente, peptide mici ş.a. ;

3) crearea condiţiilor de transfer al acestei metode din cercetare în cîmpul practicii de rutină ;

4) crearea premiselor descoperirii unor noi hormoni şi substanţe hormonoide şi a cercetării formelor lor de existenţă şi de transformare în organismele vii în stare normală şi patologică.

Ca şi alte metode şi metodele de dozare radioproteinică au unele limitări. Parte din acestea ţin de principiul de fond al metodei radioimunologice : ea măsoară porţiunea imunoreactivă a unei molecule care poate să nu coincidă cu porţiunea biologic activă a aceleiaşi molecule. Pentru a depăşi acest inconvenient, proteine izolate din receptorul tisular natural al unei substanţe biologic active sînt folosite de cîţiva ani ca proteine specifice de legare. Imprecizia determinărilor manifestată prin variabilitatea între dozări efectuate la diferite intervale este un alt aspect care tinde să fie depăşit cu ajutorul metodelor de supraveghere şi control.

Scanned with OKEN Scanner

Astăzi este practic imposibil să facem o listă exhaustivă a numeroaselor contribuţii şi a grupurilor care lucrează în domeniul dozărilor radioproteinice. Putem spune doar că numărul hormonilor peptidici dozaţi prin aceste metode trece de 25, iar numărul substanţelor peptidice şi nepeptidice dozate trece de 500; multe din acestea nu pot fi măsurate prin nici o altă metodă. Teoretic, aplicînd principiul acestor metode, poate fi măsurată concentraţia oricărei substanţe cu activitate biologică.

Paginile care urmează sînt scrise cu intenţia de a deveni un îndreptar metodologic pentru cei care vor să îmbrăţişeze acest domeniu în ansamblu, ţinînd seama că încă nu deţinem legi şi reguli precise pentru optimizarea oricărui sistem de dozare. Prin analogie, am spune că această parte generală reprezintă mai mult o încercare de a transmite tehnica pescuitului şi mai puţin oferta unor peşti gata eviscerați.

Vastele posibilităţi de rezolvare ale acestor metode au dus la extensiunea lor din interiorul endocrinologiei, unde s-au născut, la numeroase alte ramuri medicale şi nemedicale. Printre ramurile medicale care beneficiază de acest nou cîmp metodologic menţionăm: ginecologia şi obstetrica, hematologia, virusologia, microbiologia, farmacologia, oncologia, nefrologia, cardiologia, toxicologia, epidemiologia, medicina sportivă. În ultimii ani metodele de radiodozare proteinică sînt aplicate din ce în ce mai larg în medicina veterinară şi în zootehnie, în diferite ramuri ale biologiei, în industria medicamentelor.

Dezvoltarea rapidă şi practic infinită a acestor metode, izolarea continuă a noi proteine de legare, proliferarea variantelor tehnice, disponibilitatea truselor comerciale pentru dozare — ceea ce permite aplicarea lor încă mai largă — necesită o iniţiere metodologică, cum este cea pe care încercăm să o realizăm în cele ce urmează.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

RADIOIMUNOANALIZA (RIA)

1.1. ISTORIC

Înainte de anul 1960 existau mari decalaje în dezvoltarea tehnicilor de dozare hormonală pentru diferitele categorii de hormoni. Proprietăţile de structură chimică şi de solubilitate ale hormonilor tiroidieni şi ale celor steroizi au permis rezolvarea măsurării lor prin metode chimice directe (cromatografie, reacţii de culoare). Pentru hormonii peptidici însă nu există metode care să realizeze diferenţierea lor *directă* (pe baza anumitor proprietăţi fizico-chimice), de jungla proteinelor plasmatice, ale căror concentraţii sînt de bilioane de ori mai mari decît cele ale peptidelor hormonale. Folosind sisteme biologice vii, puteau fi puse în evidenţă şi cantificate numai efectele lor biologice, prin comparaţie cu efectele unei substanţe standard. Dar prea puţine sisteme biologice de dozare erau adecvate ca sensibilitate şi specificitate pentru a măsura concentraţiile plasmatice ale hormonilor polipeptidici. De exemplu, deşi dozarea biologică a ACTH în plasmă *in vivo* (depinzînd de eliberarea corticosteroizilor din glanda suprarenală) este foarte specifică, sensibilitatea este redusă şi de aceea necesită volume mari de plasmă pentru dozare. Metoda biologică de dozare a insulinei are inconvenientul că este puţin specifică. Metodele biologice de dozare a hormonilor gonadotropi erau practicabile numai pentru extracte din volume mari de urină, sensibilitatea lor fiind prea redusă pentru dozările în plasmă.

Pornind de la ipoteza că diabetul nu este datorat unui deficit de secreţie ci unei catabolizări mai rapide a insulinei, Yalow şi Berson, la Veterans Administration Hospital din New York, marchează insulina cu ^{131}I şi studiază timpul de înjumătăţire după injectarea hormonului marcat la diabetici. Surpriza a fost că la o serie de pacienţi trataţi cu insulină timpul de înjumătăţire era mai lung. Conchizînd că la aceşti pacienţi au apărut anticorpi care neutralizează insulina, au căutat să caracterizeze aceşti anticorpi ; observînd că se formează complexe solubile insulină-anticorp, care nu pot fi studiate cu ajutorul metodelor imunologice clasice, au recurs la o metodă radioelectroforetică. Cu ajutorul acesteia au putut stabili că, punînd să migreze în cîmp electric un amestec de incubare care conţine insulină marcată cu sau fără anticorpi, insulina marcată rămîne la origine pe cînd cea legată migrează în zona gamaglobulinelor. Adăugînd sistemului de incubare insulină nemarcată, ei au observat deplasarea insulinei marcate de pe anticorp. Pornind de la aceste observaţii, au preparat ser anti-insulină la cobai şi au realizat curbe doză-răspuns cu concentraţii progresive de insulină nemarcată adăugate sistemului care

Scanned with OKEN Scanner

conține insulină marcată și anticorpi anti-insulină. După cîteva publicații preliminare, în 1960, apare lucrarea cu titlul „Imunodozarea insulinei plasmatice endogene la om" [1]. Cu această lucrare au fost puse fundamentele dozărilor radioimunologice și ale radioimunologiei.

Pe un principiu tot de competiție radioproteinică, Ekins, la Middlesex Hospital Medical School din Londra, realizează o metodă de dozare a tiroxinei, folosind ca proteină de legare specifică, în locul anticorpului, proteina (globulina) plasmatică naturală și publică în anul 1960 lucrarea cu titlul „Estimarea tiroxinei în plasma umană printr-o tehnică electroforetică" [2].

Aceste lucrări au generat două noi linii de cercetare: cea a metodelor care folosesc anticorpul ca reactiv specific de legare și cea a metodelor care folosesc proteinele naturale ca reactivi specifici. Au fost preparați anticorpi pentru sute de substanțe hormonale și hormonoide sau nehormonale, antigenice sau neantigenice (haptene: steroizi, hormoni tiroidieni, oligopeptide, glicozizi, prostaglandine, droguri etc.). Au fost izolate numeroase proteine naturale circulante care leagă în mod specific substanțe biologic active: albumine sau globuline plasmatice, și, mai recent, proteine solubile sau insolubile din țesuturile receptoare.

O mare înlesnire a adus acestor studii realizarea unor cercetători englezi: Greenwood, Hunter și Glover [3], care au pus la îndemîna experimentatorilor, încă din 1963, o metodă simplă și rapidă de marcare a substanțelor polipeptidice cu iod radioactiv.

Numeroase variante tehnice, avînd la bază același principiu, au fost publicate în ultimii 17 ani. Translația din domeniul cercetării în sfera practicii de rutină, înlesnită și de disponibilitatea comercială a truselor de reactivi, a impus noi cercetări cu privire la unificarea standardelor (a substanțelor etalon), la uniformizarea exprimării rezultatelor precum și studii matematice pentru aplicarea unor criterii statistice precise de asigurare a validității și reproductibilității rezultatelor.

1.2. PRINCIPIUL ȘI COMPONENTELE SISTEMULUI DE ANALIZĂ

Metoda de analiză radioimunologică (RIA) se bazează pe competiția dintre substanța pe care o măsurăm și o substanță radioactivă, pentru locurile de legare ale anticorpului.

Întrucît reactivul cheie al metodei este anticorpul, substanța necunoscută pe care o dozăm și substanța marcată sînt considerate din punctul de vedere al proprietăților lor antigenice.

Reacția de competiție este reprezentată schematic în figurile 1.1, 1.2 și 1.3.

Dacă reprezentăm încă mai concret (fig. 1.4) desfășurarea unei reacții, putem observa care sînt principalele componente ale sistemului și etapele metodei de dozare.

Scanned with OKEN Scanner

Examinînd figura 1.1 putem descrie succint fazele unei metode de dozare radioimunologică. Peste o cantitate fixă de anticorp se adaugă o cantitate variabilă de antigen nemarcat (substanţa standard sau substanţa de dozat) şi, imediat sau după o fază de preincubare, se adaugă o cantitate fixă de antigen marcat (în exces calculat faţă de cantitatea de anticorp). După o fază de incubare în prezenţa substanţei marcate, în sistemul de dozare vor exista două compartimente principale: compartimentul complexelor formate de anticorp cu cele două substanţe (marcată şi nemarcată), numit curent fracţiunea legată (B = bound) şi compartimentul antigenelor libere sau fracţiunea liberă (F = free). Scopul metodei fiind cantificarea unei substanţe nemarcate cu ajutorul unei substanţe marcate, este necesară separarea celor două compartimente. O varietate de agenţi şi tehnici de separare, care vor fi detaliate mai departe, permit izolarea celor două compartimente şi deci măsurarea radioactivităţii în una sau în ambele fracţiuni.

Rezumînd, elementele esenţiale ale unui sistem de dozare radioimunologică sînt anticorpul, substanţa marcată, preparatul de referinţă, substanţa de dozat şi o tehnică de separare a compartimentului liber de cel legat de anticorp.

$$Ag + Ac + {}^*Ag \rightleftharpoons AgAc + {}^*AgAc + Ag + {}^*Ag$$

Fig. 1.1. — Reprezentarea schematică a reacţiei de competiţie pentru locurile de legare ale anticorpului. Ag = substanţa nemarcată prezentă în soluţia standard sau în proba necunoscută; Ac = anticorpul; *Ag = substanţa marcată; AgAc = complexul antigen nemarcat-anticorp; *AgAc = complexul antigen marcat-anticorp; Ag şi *Ag = antigen nemarcat şi marcat rămaşi liberi în soluţie; — — ⊣ = aplicarea unei tehnici de separare a complexelor antigen-anticorp de antigenele libere.

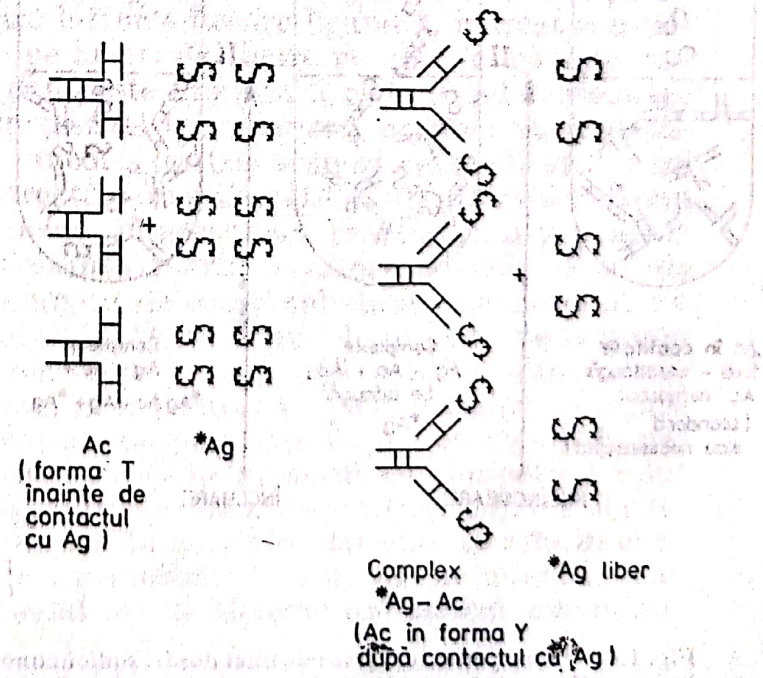


Fig. 1.2. — Bazele moleculare ale dozării radioimunologice. Reacţia în absenţa substanţei nemarcate: la 3 molecule de anticorp (Ac) cu cîte 2 locuri de combinare se adaugă 12 molecule de substanţă radioactivă (*Ag) reprezentînd 100%. După incubare 6 molecule radioactive sînt legate (= 50%) şi 6 molecule radioactive rămîn libere (= 50%). Barele din molecula de anticorp sugerează prezenţa punţilor disulfidice. Forma şerpuitoare a *Ag sugerează lanţul încolăcit al Ag proteice, o buclă poate reprezenta porţiunea imunoactivă care deţine grupările determinante antigenice şi cealaltă buclă porţiunea bioactivă, iar ţepii semnifică emisia particulelor radioactive.

Scanned with OKEN Scanner

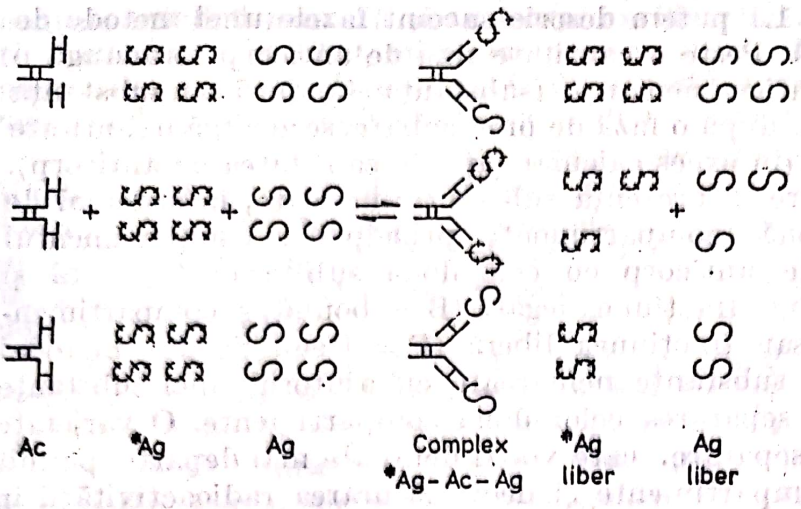


Fig. 1.3. — Bazele moleculare ale dozării radioimunologice. Reacția în prezența substanței marcate și nemarcate (standard sau necunoscută) = la trei molecule de anticorp se adaugă 12 molecule marcate (=100 %) și 12 molecule nemarcate. După incubare, în amestec se află în complexe trei molecule marcate (= 25 %) și trei nemarcate (= 25 %), rămînind libere cite 9 molecule de antigen marcat și nemarcat.

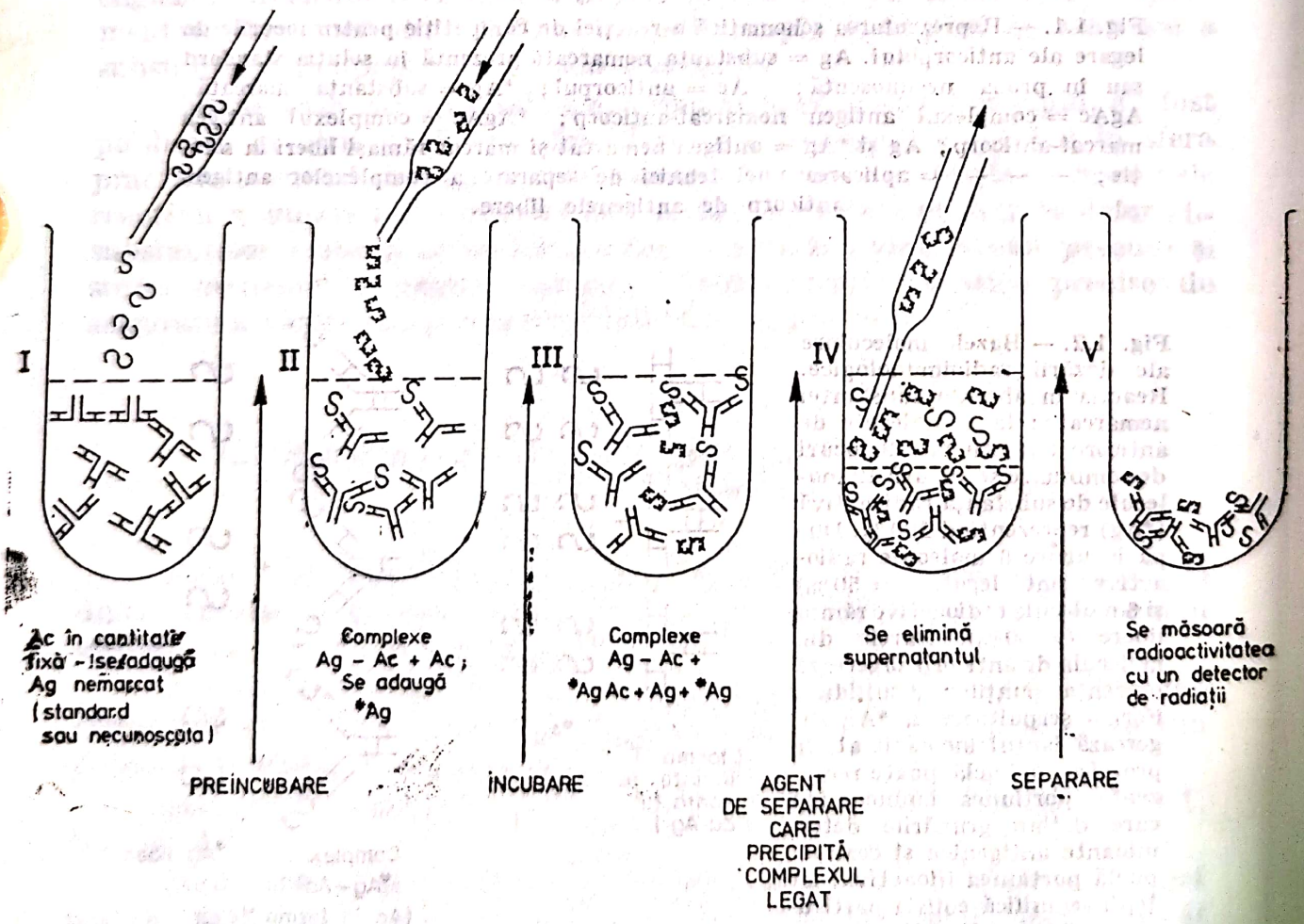


Fig. 1.4. — Componentele și fazele unei dozări radioimunologice în varianta care inelude preincubarea anticorpului cu antigenul marcat și tehnica de separare care precipită fracțiunea legată.

Scanned with OKEN Scanner

1.3. TERMINOLOGIE

1.3.1. DENUMIREA GENERALĂ A DOMENIULUI

Întrucît metodele de analiză cu izotopi radioactivi au primit o varietate de denumiri, este necesar să precizăm termenii folosiţi în capitolele care urmează. În literatura de specialitate pot fi întîlniţi o serie de termeni ca : analiză de saturare, analiză radioimunologică, analiză radioenzimatică, radiostereoanaliză, analiză cu radioligand, analiză de deplasare sau analiză radio-competitivă. O încercare de a unifica toţi aceşti termeni sub denumirea de ,,radioanaliză'' [4] pare atrăgătoare, dar acest termen include orice analiză care foloseşte izotopi radioactivi, cum sînt analiza radiochimică cu doi derivaţi izotopici [5] sau analiza prin cromatografie de gaz-lichid, care este o metodă radio-fizico-chimică [6].

Clar este că metodele la care ne referim au două laturi comune : trasorul radioactiv şi un reactiv de legare, care este totdeauna o proteină (anticorp, proteină plasmatică de tranzit, sau proteină receptoare). Aşadar, termenul general care pare mai adecvat este metodă de analiză radioproteinică. O obiecţie care se poate aduce acestui termen o constituie aceea că trasorul nu este totdeauna radioactiv [7], ca de exemplu hematia, particulele de latex sau un fluorocrom în analizele imunochimice sau o enzimă în analizele imunoenzimatice. Acestea din urmă formează însă un capitol aparte atît istoriceşte cît şi din punct de vedere metodologic, deşi au strînse relaţii de filiaţiune cu primele.

Există unele rezerve şi faţă de proteină ca agent general de legare, întrucît, teoretic cel puţin, şi alte substanţe, ca agenţii chelatici, ar putea îndeplini acest rol [7]. Totuşi, pînă în prezent toate metodele de care ne ocupăm folosesc proteine ca agenţi de legare.

Obiecţiile aduse de Murphy [7] celorlalţi termeni sînt însă justificate : într-un sistem de analiză dat, nu toate locurile de legare sînt ocupate sau saturate, iar în acele sisteme în care substanţa marcată şi cea nemarcată sînt puse în contact simultan cu proteina de legare, nu se mai poate vorbi de o analiză prin deplasare întrucît fiecare ligand *, marcat sau nemarcat, ar trebui să se plaseze pe locuri de legare pe care le găseşte neocupate ; cînd proteina de legare nu este imunitară, ca în cazul proteinelor plasmatice, proteine izolate din ţesutul receptor sau enzime, nu mai putem vorbi de o imunoanaliză ; uneori, pentru a spori sensibilitatea unui sistem de analiză, substanţa marcată este adăugată la un interval de timp după substanţa nemarcată, de aceea, în acest caz, reacţia nu mai poate fi numită competitivă întrucît substanţa marcată va ocupa acele locuri ale proteinei de legare rămase neocupate de către substanţa nemarcată. Cu toate acestea, precizează Murphy [7], toate metodele de care ne ocupăm aici sînt competitive dar nu în sensul unei competiţii între substanţa marcată şi cea nemarcată, ci în sensul unei competiţii pentru locuri de legare ale proteinei, pentru care substanţa competitoare deţine configuraţia necesară pentru a le ocupa. Menţionăm că în procesul de competiţie rolul principal îl are potrivirea configuraţiei competitorului cu locurile de legare ; însă competitori cu grad minor de potrivire dar care se află în concentraţie mare pot introduce mari perturbări în sistemul de analiză. S-ar mai putea folosi ca termen general cel de sisteme de analiză cu radio-

* Ligand vine de la termenul latin ,,de ligare'' şi înseamnă ,,care este legat''.

Scanned with OKEN Scanner

liganzi. Acest termen include şi analizele necompetitive dar ar trebui să accepte denumirea „ligand" alternativ pentru antigene şi pentru proteina de legare în funcţie de substanţa care a primit marcherul.

1.3.2. DENUMIREA CATEGORIILOR DE ANALIZE RADIOCOMPETITIVE

Radioimunoanaliza (RIA) este un termen corespunzător şi de aceea este larg acceptat şi în acest caz antigenul este marcat cu un izotop radioactiv, iar proteina de legare este anticorpul.

Metodele de analiză cu anticorpi marcaţi, numite în literatura anglo-saxonă metode imunoradiometrice (IRMA), mai pot fi numite analize cu radioanticorpi.

În metodele de analiză, care folosesc ca proteină de legare proteine plasmatice de tranzit, sistemul nu mai este imunitar, iar substanţa marcată (deşi implicit este antigen sau haptenă) este doar substanţă trasoare. Propunem pentru această categorie denumirea de analize cu radioproteine plasmatice (corespunde cu CBPA = competitive binding protein assay).

Metodele care folosesc ca proteină de legare proteine tisulare izolate din organele sau ţesuturile receptoare sînt numite radioreceptor analize (RRA).

Încercările de a unifica denumirea reactivilor de legare: anticorp, proteină plasmatică, proteină receptoare au dus la termeni ca: reactiv specific de legare, termen care ar putea sugera specificităţi reale şi absolute, ceea ce nu este decît rareori cazul, reactiv receptor [8] ar putea să ducă la confuzia că toţi reactivii de legare sînt proteine izolate din organele receptoare sau, agent saturabil [8] care ar putea sugera că reacţia este obligator o reacţie de saturare.

1.3.3. CONCLUZII

Într-o terminologie adecvată este necesar ca fiecare denumire să precizeze natura reactivilor folosiţi, aceasta conţinînd implicit atît natura reacţiei (imunitară, biochimică) cît şi modalitatea de urmărire a ei şi anume cu ajutorul unui izotop radioactiv. În fiecare denumire propusă apare cuvîntul radio (care prescurtează cuvîntul radioizotop) în imediată vecinătate cu proteine plasmatice sau cu proteine receptoare, ceea ce poate înlesni o confuzie, şi anume că proteina plasmatică sau cea receptoare este marcată cu un izotop radioactiv, aspect care nu corespunde realităţii.

1.3.4. ABREVIAŢIUNI, SINONIME ŞI NEOLOGISME

Metode

RIA = radio-imuno-analiza (în literatura anglo-saxonă şi în trusele comerciale se întîlneşte prescurtarea RIA de la Radio-Immuno-Assay, adică radioimunoanaliză).
Sinonime: radio-analiză
analiză radio-proteinică

Scanned with OKEN Scanner

analiză de deplasare
radiostereoanaliză
analiză cu radioligand etc.

IRMA = analiză imunoradiometrică (din engleză: Immunoradiometric assay)

CBPA sau CBA = analiză prin legare proteinică competitivă — cu proteine plasmatice (din engleză: competitive binding protein assay sau competitive binding assay)

RRA = radioreceptor analiză (în engleză: radioreceptor assay)

Reactivi şi substanţe

Ac sau ac = anticorp (nemarcat, rece)
*Ac sau *ac = anticorp (marcat, cald)
Ag sau ag = antigen (nemarcat, rece)
*Ag sau *ag = antigen (marcat, cald)
^{125}I-Ag = antigen marcat cu iod-125
As = antiser
H = hormon (nemarcat, rece)
*H = hormon (marcat, cald)
h = haptenă (nemarcată, rece)
*h = haptenă marcată cu un izotop radioactiv (caldă)
IgG = imunoglobulina G
PP = proteină plasmatică avînd proprietăţi de legare specifică a unor categorii de substanţe hormonale. Sinonime: tranzine, proteine transportoare sau proteine de tranzit (deşi s-ar putea să joace şi rol de depozit pentru „desfacere la cereri de urgenţă").
PR = proteine receptoare (solubile sau insolubile)
Preparat standard, sinonime: standard, preparat de referinţă, substanţă etalon, etalon
TF = tampon fosfat.

Tehnici de cantificare şi calcul

B = bound = fracţiunea legată (se păstrează termenul englez deoarece în limba română cuvintele legat şi liber au aceeaşi iniţială).
F = free = fracţiunea liberă.

Unităţi de măsură

Greutate

g = gram
dg = decigram = 10^{-1} g
cg = centigram = 10^{-2} g
mg = miligram = 10^{-3} g
µg sau ug = microgram = 10^{-6} g
ng = nanogram = 10^{-9} g
pg = picogram = 10^{-12} g
fg = femtogram = 10^{-15} g
atg = attogram = 10^{-18} g

Volum

l = litru
dl = decilitru = 10^{-1} l
cmc = centimetru cub = mililitru = ml = 10^{-3} l
µl = ul = microlitru = 0,001 ml = 10^{-3} ml.

Concentraţia

mol = cantitate de substanţă exprimată în grame, numeric egală cu masa moleculară
submultipli: mmol, µmol, nmol etc.
molaritate, mol/l (sau M) = numărul de moli dintr-o substanţă dizolvaţi în 1000 g de dizolvant;

Scanned with OKEN Scanner

nM = nano Molar = 10^{-9} M
pM = pico Molar = 10^{-12} M
fM = femto Molar = 10^{-15} M

Hormoni şi substanţe hormonoide

Hipofiza

HGH = hormon de creştere uman. Sinonime: HGH (huma growth hormone), STH (somatotropic hormone)
TSH = hormon tireostimulant (Thyroid stimulating hormone)
LH = hLH = hormon luteinizant uman (human luteinizing hormone)
FSH = hFSH = hormon foliculostimulant uman (human folicle stimulating hormone)
ACTH = hormon adrenocorticotrop (Adrenocorticotropin hormone) sau corticotrop
Prl = prolactina
MSH = hormonul melano (sau melanocito) stimulator (melanostimulating hormone)
Oxi = oxitocina
VP = vasopresina
AVP = arginin-vasopresina

Pineala

AVT = arginin-vasotocina

Hipotalamus

RF = RH = factor de eliberare sau hormon de eliberare (releasing factor sau hormone); se mai numesc şi liberine
TRH = TRF = factor de eliberare al TSH (tyreotrop releasing hormone)
GnRH = GnRF = LH/FSH-RF = LH/FSH-RH = factor de eliberare al gonadotrofinelor
CRF = factor de eliberare al corticotropului
SRIF = factor de inhibiţie a eliberării somatotropului = somatostatina.
PIF = factor de inhibiţie a prolactinei

Tiroida

Tgl = tiroglobulina
TCT = CT = tirocalcitonina sau calcitonina
T_3 = triiodotironina
T_4 = tiroxina
LATS = stimulator de durată al tiroidei (long acting thyroid stimulator); Activitatea LATS este detectabilă în fracţiunea gamaglobulinică din serul pacienţilor cu anumite tireopatii

Paratiroida

Pth = parathormonul sau hormonul paratiroidian

Gonade

T = testosterona
E = estrogeni
P = progesterona

Scanned with OKEN Scanner

Alte prescurtări

Angstrom = Å = 1×10^{-10} metri, sau 0,1 nm (nanometru).
CS = curbă standard, curbă de referință, curbă etalon.
GM = greutate moleculară.

BIBLIOGRAFIE

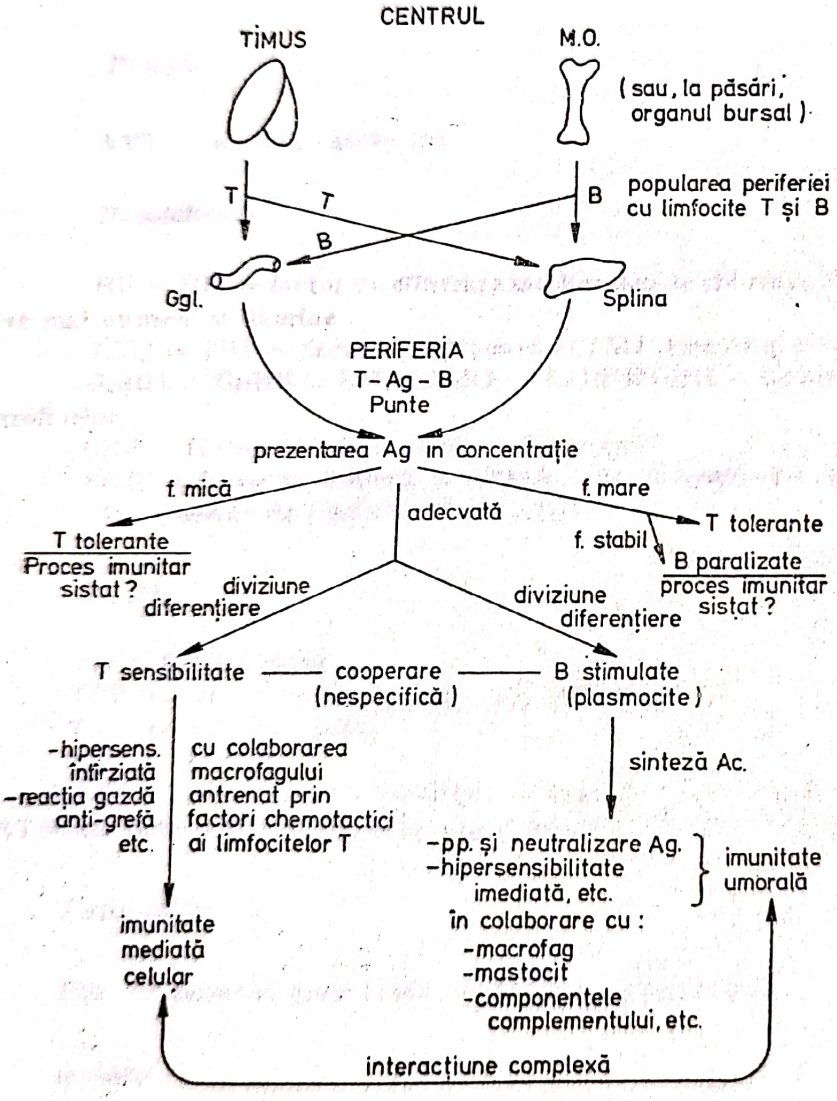
1. R.S. Yalow, S.A. Berson, *J. Clin. Invest.*, **39**, 1157 (1960).
2. R.P. Ekins, *Clin. Chim. Acta*, **5**, 453 (1960).
3. F.C. Greenwood, W.M. Hunter, J.S. Glover, *Biochem. J.*, **89**, 114 (1963).
4. G. Rosselin, în „*Traité de médecine nucléaire*", Flammarion Méd. Sci., Paris, 1975, vol. 1, p. 199.
5. J. Saroff, R.E. Keenon, H.A. Sandberg, W.R. Staunwhite Jr., *Steroids*, **10**, 15 (1967).
6. H. Ch. Curtius, în „Clinical Biochemistry", editat de H. Ch. Curtius și M. Roth, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1974, vol. 1, p. 706.
7. B.E.P. Murphy, în „Nuclear Medicine", editat de H.N. Wagner Jr., H.P. Publ. Co. Inc. Publishers, New York 1975, p. 233.
8. R.P. Ekins, *Brit. Med. Bull.*, **30**, 3 (1974).

Scanned with OKEN Scanner

2.1. ANTICORPUL — ASPECTE GENERALE

2.1.1. DEFINIȚIE

Anticorpii sînt substanțe proteice sau proteide (glico-proteine) care apar în organism în urma stimulării sistemului anticorpo-formator cu o substanță antigenică și reacționează cu substanța care i-a produs. Mecanismul formării anticorpilor este complex și încă insuficient clarificat. În fig. 2.1 este prezentată o încercare de sistematizare a principale-



ex.: Ac. reglează funcția celulelor T și B prin fenomene de
- inhibiția răspunsului (elimină Ag. din țesutul limfatic)
- inducerea toleranței (formează complexe Ag-Ac tolerogene)
- stimularea răspunsului (fixează Ag. pe organele limfoide)

Fig. 2.1. — Lanțul schematic al proceselor imunității umorale și celulare la vertebrate.

Scanned with OKEN Scanner

lor evenimente care duc la formarea anticorpilor. Stimulul antigenic duce la două categorii de răspuns imunitar : celular şi umoral. În cele ce urmează va fi tratat numai răspunsul umoral cu formare de anticorpi.

2.1.2. CARACTERISTICI FIZICO-CHIMICE

Încă de la începutul acestui secol a fost stabilită natura proteică a anticorpilor şi caracterul lor de globulină. Lucrările lui Tiselius [1] şi Tiselius şi Kabat [2] din anii 1935—1938 au stabilit, pe baza migrării electroforetice, clasificarea globulinelor serice în α, β şi γ, anticorpii migrînd mai ales cu γ-globulinele (fig. 2.2). Cu aceste lucrări a început

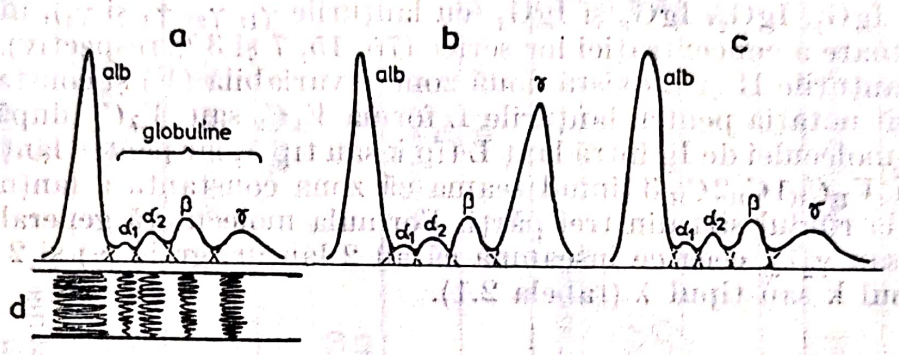


Fig. 2.2. — Asocierea activităţii anticorp cu fracţiunea gamaglobulinică din ser : *a*) electroforeza serului unui animal înainte de imunizare; *b*) electroforeza serului aceluiaşi animal după hiperimunizare ; *c*) electroforeza serului de la animalul hiperimunizat după absorbţia cu antigenul corespunzător ; *d*) benzile electroforetice obţinute cu serul înainte de imunizare.

studiul structurii anticorpilor, problemă pusă explicit de Arrhenius încă din 1907, cînd a creat termenul de imunochimie. Astăzi, anticorpii sînt numiţi cu un termen general — imunoglobuline (Ig), adică globuline care apar în sînge în urma unei succesiuni de procese imunitare generate de un stimul antigenic. Stimulul antigenic determină creşterea cantităţii de Ig din ser, aceste Ig avînd proprietatea de „anticorpi", adică pot reacţiona *in vivo* şi *in vitro* cu antigenul care le-a produs. Ig migrează electroforetic cu fracţiunile α, β sau mai ales γ-globulinice. Criteriul unor particularităţi structurale a stat la baza clasificării Ig în cinci clase : IgG, IgA, IgM, IgD şi IgE în ordinea descrescătoare a concentraţiei lor în ser.

Ig sînt proteine policatenare [3] alcătuite din două lanţuri polipeptidice cu greutate moleculară şi secvenţă a aminoacizilor diferite : lanţul greu (Heavy) sau H, cu greutate moleculară mare şi lanţul uşor (Light) sau L, cu greutate moleculară mică. Diferenţa între cele cinci clase de Ig este dată mai ales de secvenţa diferită a lanţului H, clasa fiind simbolizată prin literele greceşti corespunzătoare : IgG (γ), IgM (μ), IgA (α), IgD (δ) şi IgE (ε). Lanţurile L sînt şi ele de două tipuri : tipul lambda (λ) şi tipul kappa (k). Acestea nu coexistă niciodată în aceeaşi moleculă de Ig.

Componenta majoră a fracţiunii anticorp din antiserurile folosite în sistemele de dozare radioimunologică este clasa IgG (γ) cu greutate moleculară (*GM*) de aproximativ 150 000 şi coeficient de sedimentare 7S,

formată mai ales după inoculări repetate — (răspuns secundar) — dar și la stimulul primar și în mai mică măsură din IgM (μ), 19S cu GM 900 000 formați ca urmare a stimulului antigenic primar, dar și în timpul stimulului secundar.

Molecula de IgG este alcătuită din cîte două perechi de lanțuri H cu $GM = 49\,000 - 51\,000$ și L cu $GM = 22\,000 - 23\,000$ unite prin legături disulfidice în ordinea L—H—H—L.

2.1.3. SUBCLASIFICĂRI ȘI NOTAȚII

La rîndul lor, moleculele anticorp din clasa IgG au fost clasificate, pe baza unor particularități ale secvenței și GM a lanțurilor H, în patru subclase : IgG_1, IgG_2, IgG_3 și IgG_4 (cu lanțurile γ_1, γ_2, γ_3 și γ_4), în ordinea descrescătoare a concentrației lor serice (75, 15, 7 și 3 % respectiv).

În lanțurile H și L există două zone : variabilă (V) și constantă (C). S-a stabilit notația pentru lanțurile L forma V_kC_k sau $V_\lambda C_\lambda$ după cum în structura moleculei de Ig intră lanț L tip k sau tip λ, iar pentru lanțurile H : V_HC_H sau $V_HC_H1C_H2C_H3$ ținînd seama că zona constantă a lanțului este alcătuită la rîndul său din trei părți. Formula moleculară generală a IgG este γ_2k_2 sau $\gamma_2\lambda_2$, ceea ce înseamnă că au 2 lanțuri grele (γ) și 2 lanțuri ușoare tipul k sau tipul λ (tabela 2.1).

2.1.4. STRUCTURA CHIMICĂ A IMUNOGLOBULINELOR

Particularitățile structurale au fost stabilite pe două căi : a) experiențe de scindare prin proteoliză enzimatică sau cu bromcian și b) experiențe de disociere a lanțurilor polipeptidice prin ruperea punților disulfidice cu ajutorul agenților reducători. Combinarea acestor metode a permis ca pe fragmentele obținute să poată fi studiate compoziția chimică și arhitectura moleculelor de Ig.

Disocierea enzimatică în fragmente. Fiecare moleculă de IgG (de Ig în general) este alcătuită din două perechi de lanțuri grele (cu GM de $2 \times 53\,000$) și două perechi de lanțuri ușoare (cu GM de aproximativ 23 000) unite între ele prin punți disulfidice interlanț, în fiecare lanț existînd și punți disulfidice numite intralanț (fig. 2.3).

Tratarea cu *papaină* a moleculei de IgG o disociază în trei fragmente : două fragmente Fab* identice și un fragment Fc** ·Fab este alcătuit dintr-un lanț ușor și o porțiune aminoterminală a lanțului greu, numită Fd; Fab leagă antigenul dar nu-l precipită. Fragmentul constant (Fc) este jumătatea carboxiterminală a lanțului greu.

Digestia enzimatică cu *pepsină* scindează molecula de IgG mai aproape de capătul carboxiterminal, iar fragmentul obținut conservă punțile disulfidice interlanț greu și conține deci un lanț ușor și ceva mai mult de o porțiune Fd a lanțului greu. Din fiecare moleculă de IgG se desprind astfel două fragmente Fab like care rămîn unite

---

* Fragmentul care leagă antigenul (antigen binding) dar poartă și situsurile alotipice și unele izotipice.

** Fragmentul cristalizabil poartă majoritatea situsurilor izotipice și răspunde de fixarea complementului și de trecerea barierei placentare.

TABELA 2.1

Tablou rezumativ al caracteristicilor IgG

Fizico-chimice	Migrare electro-foretică	*GM* daltoni	Constanta de sedimentare $S_{20\,w}$	Nr. lanţuri polipeptidice	Formula	Nr. resturi aminoacizi	Conţinut în hidraţi de carbon %
	Zona gamma	150 000	7 (6—8)	4 (2 grele+2 uşoare)	γ_2k_2 sau $\gamma_2\lambda_2$	1 310	3

Formă şi dimensiuni	Forma generală	Dimensiuni Å	Suprafaţa Å²	Forma dispoziţiei lanţurilor
	Cilindru elipsoidal necompact	240 × 19 × 57 sau axa lungă = 250 — 270 axa scurtă = 35 — 40	70 000	în T înainte de contactul cu Ag; în Y după contactul cu Ag

Sinteza şi distribuţia	Rata sintezei mg/kg corp/zi	Concentraţia mg/ml ser	Intravascular %	Extravascular %
	34	12 (8—16)	45	55

Eterogenitate	Nr. subclase	Clase în interiorul subclaselor	Specificitate antigenică
	[4](IgG$_1$, IgG$_2$, IgG$_3$, IgG$_4$)	Alotipuri (determinante antigenice caracteristice unei specii)	Idiotipuri unice (determinante antigenice prezente la un singur individ)

Metabolism (Waldmann)	$T_{1/2}$ zile	Catabolizare intravascular % pe zi
	23	4,6—6,9

Fiziologie	Valenţa	Fixarea complementului	Precipitare Ag	Legarea Ag fără precipitare
	2	IgG	$F(ab)_2$	Fab

Locuri cu semnificaţie funcţională	V_H, V_L	Fc, Fd	V_HV_L (în sau lîngă situsul de combinare cu Ag)
	situsuri de combinare cu Ag = valenţa	marcheri genetici	determinanţi antigenici ai moleculei de IgG

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 2.1

Tablou rezumativ al caracteristicilor IgG

Fizico-chimice	**Migrare electroforetică**	***GM* daltoni**	**Constanta de sedimentare $S_{20\,w}$**	**Nr. lanţuri polipeptidice**	**Formula**	**Nr. resturi aminoacizi**	**Conţinut în hidraţi de carbon %**
	Zona gamma	150 000	7 (6—8)	4 (2 grele + 2 uşoare)	γ_2k_2 sau $\gamma_2\lambda_2$	1 310	3
Formă şi dimensiuni	**Forma generală**		**Dimensiuni Å**		**Suprafaţa Å²**	**Forma dispoziţiei lanţurilor**	
	Cilindru elipsoidal necompact		240 × 19 × 57 sau axa lungă = 250 — 270 axa scurtă = 35 — 40		70 000	în T înainte de contactul cu Ag; în Y după contactul cu Ag	
Sinteza şi distribuţia	**Rata sintezei mg/kg corp/zi**		**Concentraţia mg/ml ser**		**Intravascular %**	**Extravascular %**	
	34		12 (8—16)		45	55	
Eterogenitate	**Nr. subclase**		**Clase în interiorul subclaselor**			**Specificitate antigenică**	
	[4](IgG$_1$, IgG$_2$, IgG$_3$, IgG$_4$)		Alotipuri (determinante antigenice caracteristice unei specii)			Idiotipuri unice (determinante antigenice prezente la un singur individ)	
Metabolism (Waldmann)		**$T_{1/2}$ zile**				**Catabolizare intravascular % pe zi**	
		23				4,6—6,9	
Fiziologie	**Valenţa**		**Fixarea complementului**		**Precipitare Ag**	**Legarea Ag fără precipitare**	
	2		IgG		$F(ab)_2$	Fab	
Locuri cu semnificaţie funcţională	V_H, V_L		Fc, Fd		V_HV_L (în sau lîngă situsul de combinare cu Ag)		
	situsuri de combinare cu Ag = valenţa		marcheri genetici		determinanţi antigenici ai moleculei de IgG		

Scanned with OKEN Scanner

între ele prin punți disulfidice interlanț, de aceea se notează $F(ab')_2$. Aceste două fragmente unite între ele sînt deci bivalente și dau reacții de precipitare cu antigenul.

Studii la microscopul electronic cu haptene bivalente mici (lungime 25 Å) de tipul DNP (bis-N-DNP-octametilendiamină) legate pe IgG de iepure anti-DNP sau cu fragmente $F(ab')_2$ au permis studiul formei și

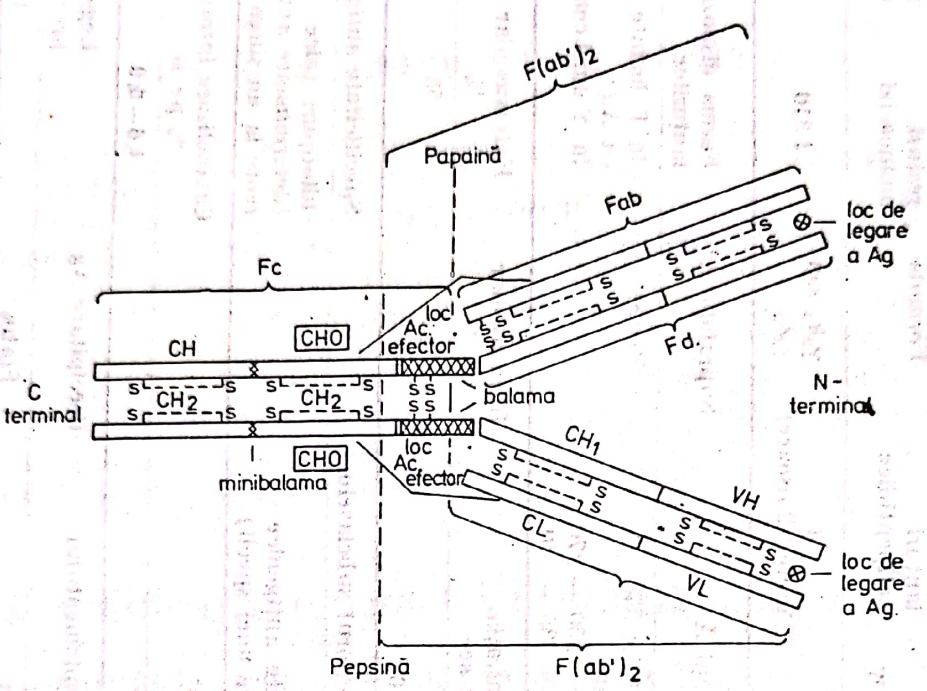


Fig. 2.3. — Reprezentarea schematică a unei molecule de IgG_1 [4, 15, 16, 18]. — — — locurile de scindare cu papaină sau cu pepsină; $\overline{|CHO|}$ componenta glucidică; S— — —S legături disulfidice intralanț; —S S— legături disulfidice interlanț; CH porțiunea constantă a lanțului greu; CL porțiunea constantă a lanțului ușor; V_H porțiunea variabilă a lanțului greu: V_L porțiunea variabilă a lanțului ușor; Fc fragment constant obținut prin tratare cu pepsină; Fab fragment care se combină cu Ag, obținut prin tratare cu pepsină; domeniile $V_L + V_H$ = loc de recunoaștere a Ag; domeniile $CL + CH_2$ = loc anticorp efector; CH_1, CH_2, CH_3 = domenii ale lanțului greu (peptide în bucla S—S) (după [4—9]).

dimensiunilor fragmentelor. S-a observat că haptena leagă împreună moleculele anticorp în formă de Y pentru a forma dimeri, trimeri, tetrameri și pentameri [10] (fig. 2.4).

Compoziția chimică și structura primară: Molecula de IgG este o globulină cu greutatea moleculară (*GM*) de aproximativ 150 000 —200 000 daltoni și coeficient de sedimentare 6 —8 S conținînd 3 —12% hidrați de carbon. Și lanțurile ușoare și lanțurile grele au o extremitate carboxiterminală, constantă și una aminoterminală, variabilă. Menționăm că noțiunea de „variabil" se aplică numai comparativ între molecule, una și aceeași moleculă fiind în întregime constantă (fig. 2.3). Lanțul ușor Kappa (k) este alcătuit din 214 acizi aminați, cîte 107 pentru fiecare extremitate, iar lanțul lambda (λ) din 213 —216 aminoacizi. Lanțul greu este alcătuit din 440 aminoacizi, dintre care 330 pentru porțiunea C-terminală și 110 pentru porțiunea N-terminală. Zona constantă a lanțurilor grele ale IgG poartă un număr mare de determinante antigenice, secvențe de amino-

Scanned with OKEN Scanner

acizi invariabile, care conferă moleculei specificitatea sa antigenică. Au fost puse în evidenţă determinante izotipice (caractere comune tuturor indivizilor din aceeaşi specie), care permit subclasificarea IgG în 4 subclase: IgG_1 (γ_1), IgG_2 (γ_2), IgG_3 (γ_3) şi IgG_4 (γ_4) care poartă lanţuri grele γ_1, γ_2, γ_3 şi respectiv γ_4.

Zona aminoterminală variabilă a lanţurilor greu şi uşor formează împreună „locurile anticorp" sau „situsurile de combinare", adică locurile de legare ale antigenului sau haptenei pe anticorp, conferind astfel moleculei specificitatea sa de anticorp faţă de determinantele antigenice.

Zonele aminoterminale ale lanţurilor grele şi uşoare sînt caracterizate prin variabilitatea secvenţei aminoacizilor din compoziţia lor. Gradul de variabilitate nu este însă uniform, existînd poziţii hipervariabile sau „fierbinţi", iar primele poziţii de la capul N-terminal sînt relativ constante — „punctele invariante".

Secvenţele aminoacizilor din zonele variabile ale lanţurilor uşoare (V_L) şi grele (V_H) sînt omologe, dar diferă de zonele constante corespunzătoare. Asemănarea între V_L şi V_H din aceeaşi moleculă este mai accentuată decît între V_L şi V_H din molecule diferite de IgG. În mijlocul lanţului greu se află o zonă cu secvenţă de aminoacizi distinctă de cea a V_H şi C_H şi se numeşte zona „balama". Această polipeptidă scurtă, elastică, uneşte zonele Fab şi Fc.

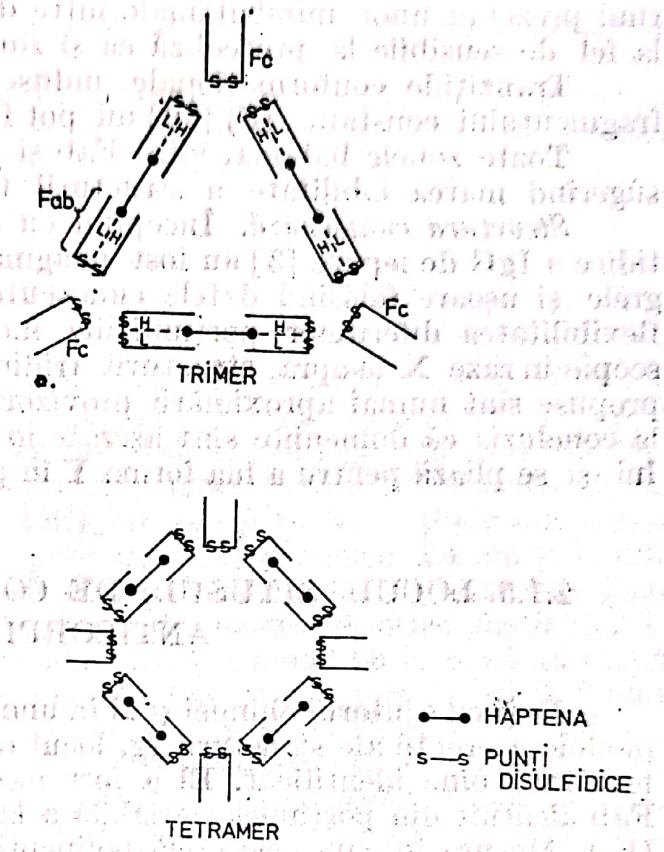


Fig. 2.4. — Reprezentare schematică a complexelor haptenă-anticorp (după [8, 9]).

Componenta glucidică este eterogenă; au fost identificate în special hexoze (galactoză, manoză), N-acetil-glucozamină, fucoză şi acid sialic. Oligozaharida este legată covalent de lanţul peptidic prin legăturile N-glucozidice formate între asparagină şi N-acetil-glucozamină şi este localizată în fragmentul constant (Fc) al lanţului greu. Şi în Fab, pe fragmentul Fd sau pe V_L se găseşte o oligozaharidă mai mică. S-a sugerat că oligozaharida mică ar putea fi distribuită asimetric, fiind legată numai de unul din cele două lanţuri Fab [11].

Structura secundară. Prin determinări fizico-chimice (dispersie optică rotatorie, dicroism circular, spectroscopie în infraroşu, depolarizarea fluorescenţei) efectuate asupra moleculei de IgG nu s-au putut pune în evidenţă structuri α-spiralate (α-helix). În absenţa acestui tip de ordonare, molecula de IgG beneficiază de o mai mare flexibilitate, asigurată şi prin modul de aranjare a lanţurilor polipeptidice în structură de tip β mai puţin ordonată [11].

Structura terțiară. Configurația spațială a lanțurilor ușoare și grele este orientată de prezența în lanțurile polipeptidice a punților (buclelor) disulfidice intralanț: două pentru lanțul ușor și patru pentru lanțul greu. Aceste punți permit distincția unor domenii cu structură compactă, unite prin legături peptidice scurte. Un domeniu cu *GM* de 12 000 daltoni, cuprinde o legătură disulfidică și este alcătuit din aproximativ 100 aminoacizi.

Proteoliza limitată a lanțurilor a permis disocierea domeniilor, sugerînd prezența unor minibalamale între domenii, aceste mici peptide fiind la fel de sensibile la proteoliză ca și zona balama dintre Fab și Fc.

Tranzițiile conformaționale induse prin scăderea pH-ului în zona fragmentului constant (F) [12] nu pot fi obținute în Fab nici la pH =2.

Toate zonele balama, între Fab și Fc și între domenii sînt flexibile sugerînd marea labilitate a structurii terțiare a IgG.

Structura cuaternară. Începînd cu stabilirea structurii tetrapolipeptidice a IgG de iepure [3] au fost imaginate modele spațiale ale lanțurilor grele și ușoare folosind datele cunoscute privind dimensiunea, forma și flexibilitatea diferitelor porțiuniriile moleculei. Lipsind date de microscopie în raze X asupra structurii tridimensionale a moleculei, modelele propuse sînt numai aproximării provizorii. Ipoteza domeniilor [13] a dus la concluzia că domeniile sînt așezate în formă de T în absența antigenului și se pliază pentru a lua forma Y în prezența antigenului [4].

2.1.5. LOCUL (SITUSUL) DE COMBINARE ȘI VALENȚA ANTICORPILOR

Deși cu ajutorul chimiei și al imunologiei s-a reușit constituirea unor modele coerente ale structurii Ig, locul de combinare al antigenului nu a fost încă bine identificat. El a fost *localizat intercatenar* în fragmentul Fab alcătuit din porțiunea variabilă a lanțului greu (V_H) și a celui ușor (V_L). Măsura în care cele două polipeptide V_H și V_L contribuie la alcătuirea locului de combinare a fost mult timp controversată [7] și nu este destul de clară. Se pare că *afinitatea* pentru antigen necesită integritatea fragmentului Fab, separarea celor două catene V_H și V_L ducînd la scăderea afinității nu însă și a *specificității* în reacția cu antigenul. Contribuția la realizarea afinității pentru antigen pare mai substanțială la V_H decît la V_L. Deplierea moleculei anticorp cu agenți ce rup legăturile necovalente și disulfidice, anulează capacitatea anticorpului de a reacționa cu antigenul; ruperea legăturilor de hidrogen în prezența haptenei nu influențează configurația spațială a Fab.

La alcătuirea locului de combinare participă 15 aminoacizi din Fab, dînd o structură cu dimensiunile 34 ×12 ×6Å [14] și suprafața de aproximativ 1 000 Å^2 (mai mult de 1% din suprafața totală). Aceste dimensiuni pot fi asigurate de 10—20 aminoacizi, ceea ce corespunde tot la aproximativ 1% din numărul total al aminoacizilor din molecula de IgG [15]. Studiile de identificare a aminoacizilor din structura locului de combinare care participă la legarea specifică a antigenelor au arătat că aceștia variază în funcție de încărcarea haptenei care a dus la formarea anticorpului. De exemplu, o haptenă pozitivă induce formarea unor anticorpi care au în compoziția locului de combinare aminoacizi negativi, ca acid glutamic sau acid aspartic; iar o haptenă negativă induce structuri cu aminoacizi

Scanned with OKEN Scanner

pozitivi, ca arginina sau, mai rar, lizina, dar şi tirozina. Tirozina a fost identificată şi în V_H şi în V_L, unele secvenţe scurte ale locului de combinare au fost situate între poziţiile 85 şi 120 ale V_H [15].

Experienţele de marcare prin afinitate [16] au arătat că intervalele de aminoacizi implicate în fixarea efectivă a haptenelor situate între poziţiile 33 şi 100 corespund zonei hipervariabile a lanţurilor V_L şi V_H care, deci, determină specificitatea locului de combinare şi fixează antigenele.

Valenţa anticorpilor arată numărul de locuri de combinare dintr-o moleculă de anticorp. Experienţe folosind diferite metode au dus la concluzia (poate provizorie) că în molecula de IgG sînt două locuri de combinare, deci IgG are valenţa 2 [17].

Printre metodele utile pentru determinarea valenţei este şi metoda dializei la echilibru care permite şi măsurarea constantei de asociere (afinitate) dintre anticorp şi haptena specifică [18].

2.1.6. ALOTIPURI ŞI IDIOTIPURI

În afară de eterogenitatea structurală a lanţurilor grele din IgG asociată cu specificitatea claselor şi subclaselor, mai există un alt tip de variaţie care ţine de prezenţa formelor alelice. Tot aşa cum între globulele roşii, la indivizi (oameni) genetic diferiţi, sînt diferenţe în termeni de sistem antigenic de grup sanguin ABO, tot aşa şi lanţurile grele din aceeaşi subclasă pot diferi ca expresie a grupurilor lor alotipice. La om şi la diferite specii de animale au fost identificate variante de Ig controlate genetic. Marcherii alotipici sînt controlaţi de locuri genetice distincte, iar variantele alelice date de prezenţa factorilor genetici au la bază un număr redus ($\geqslant 1$) de substituţii de aminoacizi. La om de exemplu au fost identificaţi doi marcheri genetici: Gm (genetic marker) caracteristic lanţului greu şi Inv (inhibitor V — de la Victor, numele pacientului) observat numai pe lanţul uşor. Pentru sistemul Gm au fost găsite 25 de alotipuri, iar pentru sistemul Inv, trei. Structura cuaternară a IgG este esenţială pentru exprimarea specificităţii alotipice pentru unii factori ai sistemului Inv şi Gm.

La iepure se cunosc patru locusuri care controlează specificitatea alotipică a lanţurilor grele (a, d, e şi Ms) şi 2 locusuri pentru lanţurile uşoare (b şi c).

Restricţia numărului de marcheri genetici apare în mod natural (fenomenul de excludere alelică), în cazuri patologice (mielom) sau poate fi provocată (specific — cu antiser).

Se ştie că o celulă plasmatică sau o clonă (celule derivate din aceeaşi celulă-mamă) de celule produce un singur marcher genetic sau o anumită constelaţie de marcheri în care se poate exprima numai una din alelele locusului genetic activat [11]. Acest fenomen numit excludere alelică a fost atestat prin experienţe care arată că într-o celulă se sintetizează anticorpi dintr-o singură *clasă* de Ig, iar dacă clasa de Ig este IgG atunci ei aparţin unei singure *subclase* şi moleculele anticorp fabricate poartă un singur determinant alelic.

Întrucît în serul unui individ imunizat pot apărea mai mulţi factori alotipici, se poate deduce că populaţia de celule formatoare de anticorpi este eterogenă şi că, în interiorul ei, fiecare clonă produce Ig cu marcheri alotipici diferiţi.

Scanned with OKEN Scanner

Excluderea unui anumit alotip poate fi obținută și experimental, administrînd la animale nou-născute (iepuri, șoareci) seruri antialotip, adică anticorpi față de unul din determinanții alelici ai heterozigotului [19]. De remarcat că, dacă se administrează unui iepure nou-născut, heterozigot pentru locusul b (b^2, b^5), ser anti-b^2, activitatea alelei b^2 este deprimată și activitatea alelei b^5 crește compensator.

Specificitatea *idiotipică* este specificitatea *antigenică* a unei populații de molecule anticorp fabricate de un singur individ. Anticorpii cu aceeași specificitate față de un antigen, produși de indivizi diferiți din aceeași specie, nu poartă specificități antigenice comune. Determinanții idiotipici sînt localizați în $F(ab')_2$ în sau lîngă situsul de combinare.

Alt tip de eterogenitate are drept cauză particularitățile structurale ale antigenului care a produs anticorpii. O numim eterogenitate antigenică xenotipică (tabela 2.2).

TABELA 2.2

Tipurile de eterogenitate și tipurile de specificitate derivate

Tip de eterogenitate	Descriere	Tip de specificitate
structurală	5 lanțuri grele: G, M, A, D, E lanț greu IgG	5 clase: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 4 subclase: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4
genetică (alelică)	determinanți alelici sau marcheri pe lanț greu și ușor și factori alelici	alotipică: sisteme alelice cu variante alelice specifice clasei, din interiorul subclasei
antigenică (idiotipică)	în sau lîngă situsul de combinare al anticorpului	idiotipică caracteristică populației de anticorpi produsă de un singur individ
antigenică (xenotipică)	produsă de particularitățile structurale ale antigenului	xenotipică unică pentru fiecare structură antigenică inoculată

Eterogenitatea unei populații de anticorpi poate fi restrînsă (limitată), obținîndu-se *anticorpi omogeni* dacă se folosesc pentru imunizare antigene care posedă un singur determinant antigenic nerepetitiv. Și imunizarea prelungită a animalelor favorizează menținerea numai a clonelor care produc anticorpi cu afinitate mare, limitînd astfel eterogenitatea anticorpilor. Se pare însă că afinitatea anticorpilor obținuți prin imunizări îndelungate scade în timp . O populație omogenă de anticorpi trebuie să îndeplinească următoarele condiții [11]:

— bandă electroforetică unică și îngustă;

— specificitate antigenică individuală, adică antiserurile, preparate față de acea populație presupus omogenă de anticorpi, să reacționeze cu anticorpii și după absorbția cu Ig din clasa și subclasa căreia îi aparțin anticorpii;

— să aparțină unei singure subclase de Ig;

— să aibă o constantă de asociere (K_0) a antigenului omogenă (relația doză-răspuns să dea o dreaptă, nu o curbă);

Scanned with OKEN Scanner

— lanţurile uşoare (L) să fie electroforetic omogene la electroforeza în gel de poliacrilamidă;
— secvenţa aminoacizilor să fie unică.

2.1.7. CONCLUZII ŞI PERSPECTIVE

— Diferitele tipuri de eterogenitate a anticorpilor permit o mare diversificare a specificităţii şi a afinităţii pentru antigen.
— Diversificarea specificităţii şi a afinităţii este utilă procesului de apărare a organismelor dar reprezintă un impediment în folosirea anticorpilor ca reactiv într-o tehnică de dozare cantitativă a unui antigen (hormon) cu structură chimică precisă.
— Molecula de Ig poartă, ca şi hormonii sau enzimele, două categorii de structuri: antigenică sau producătoare de anticorpi şi biologic activă care se combină specific cu antigenul. Observăm că în cele două structuri molecula joacă roluri opuse: de antigen şi de anticorp.
— Porţiunea antigenică a moleculei de IgG pare să coincidă sau să coexiste în imediata apropiere a situsului de combinare cu antigenul.
— Variantele moleculare de IgG, pe care le poate realiza celula formatoare de anticorpi au ca adresă realizarea unor relaţii intermoleculare specifice (exemplu relaţia cu antigenul) sau distincţia caracteristicilor de clasă, subclasă, specie, individ în interiorul unei mulţimi de populaţii).
În perspectivă, deziderate ale radioimunologiei, ca obţinerea unor anticorpi cu specificitate dirijată şi afinitate optimală, depind de progresele cunoaşterii fenomenului de excludere alotipică şi a metodelor de restrîngere a eterogenităţii, care au implicaţii în realizarea „omogenizării dirijate" a unei populaţii de anticorpi.

2.2. FORMAREA ANTICORPILOR

Sinteza proteinelor anticorp de către celulele formatoare de anticorpi este un proces iniţiat de prezenţa unei substanţe antigenice în organismul unui animal. Structura anticorpului, ca a oricărei molecule proteice, este determinată de secvenţa aminoacizilor în lanţurile polipeptidice liniare care alcătuiesc molecula. La rîndul ei, secvenţa aminoacizilor este determinată de secvenţa nucleotidelor din ADN cromozomial al genei care conţine informaţia. Aşadar o celulă formatoare de anticorpi, ca orice celulă care sintetizează proteine, poate produce o proteină numai dacă structura primară a acestei proteine este bine codificată în genele acelei celule. Mecanismele prin care un organism animal, care nu a întîlnit niciodată o anumită structură antigenică (de exemplu, o moleculă creată prin sinteză organică în laborator), produce anticorpi specifici pentru acea moleculă, nu sînt suficient de bine clarificate.

Se ştie că antigenul induce formarea anticorpilor în celulele limfoide, dar prezenţa lor în celulă nu este necesară (nu a fost detectată) în timpul anticorpogenezei. O celulă limfoidă (celula B) produce cam 2 000 de molecule anticorp circulant pe secundă şi organismul uman posedă aproximativ 10^{12} limfocite, deci 2.10^{10} limfocite/kg corp. La stimularea cu un antigen numai un mic procent din acestea răspund prin formarea anticorpilor specifici. Ţinînd seama că rata sintezei anticorpilor este în medie de 35 mg/kg corp/zi, rezultă că aproximativ 1% din limfocitele totale sînt antrenate în anticorpogeneză la o stimulare antigenică.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.1. ANTIGENUL — ASPECTE GENERALE

Noţiunea de antigen a intrat în circulaţie în ultimul deceniu al secolului trecut, odată cu observaţiile lui Behring şi Kitasato (1890), ale lui Pfeiffer (1893—1895) şi ale lui Bordet (1895) privind capacitatea imunizantă a dozelor mici de toxine sau a suspensiilor de bacterii omorîte. Antigen, în sens larg, este orice substanţă care determină apariţia unor reacţii imunitare în organism. În cadrul problemei de care ne ocupăm, ne interesează numai reacţiile imunitare care duc la formarea anticorpilor circulanţi de tip IgG sau mai exact capacitatea unor substanţe de a induce formarea anticorpilor, pe care o numim, impropriu şi provizoriu, capacitate imunogenă.

Din punct de vedere imunologic, o substanţă antigenică este caracterizată şi definită prin gradul său de antigenicitate (potenţialul antigenic) şi prin tipul de specificitate.

În sens restrîns, o substanţă poate fi considerată antigen, dacă introdusă în organism incită producerea de anticorpi cu care reacţionează specific (are deci capacitate anticorpogenă).

Teoretic, orice substanţă proteică, lipidică sau glucidică poate deţine un potenţial antigenic. Practic însă, deosebim antigene complete, care incită formarea anticorpilor *in vivo* (sînt imunogene) şi reacţionează specific cu ei *in vitro* şi antigene incomplete sau haptene. Haptenele sînt substanţe care injectate unui animal nu incită formarea anticorpilor, dar sînt capabile să reacţioneze specific *in vitro* cu anticorpii fie pentru a da o reacţie de precipitare, fie pentru a inhiba precipitarea antigenului complet (care conţine şi haptena) cu anticorpul corespunzător. Exemple sînt TRH (tireotrop releasing hormone) sau hormonii steroizi. Între haptene sînt incluse şi grupările de pe molecula antigenelor naturale care determină specificitatea, adică se leagă la locul de combinare al anticorpului [20]. Exemple sînt iodotironinele din molecula de tiroglobulină.

Capacitatea generală de antigenitate a unei substanţe reprezintă o rezultantă integrată a unor condiţii variate. Nici una din condiţii nu este suficientă, ci doar necesară [21] (tabela 2.3). Analiza acestor condiţii ajută alegerea constelaţiei favorabile obţinerii unor antiseruri adecvate [21].

TABELA 2.3

Condiţii pentru realizarea capacităţii imunogene a unei substanţe

Condiţia	Realizarea optimală
Specificitatea de specie	cît mai depărtată de specia la care se inoculează
Natura chimică	proteică, polipeptide mari (nu numai)
Greutatea moleculară	peste 5000
Structura internă	fixă
Configuraţia spaţială	rigidă, stabilă
Mod de administrare	doză adecvată (netolerogenă, neparalizantă)
	remanenţă suficientă (solubilitate mică, înglobare în adjuvanţi)
	loc de inoculare care să antreneze larg sistemul limfoid
Capacitatea imunoreactivă a animalului	pregătire prin inocularea unor stimulatori imunitari nespecifici

Scanned with OKEN Scanner

2.2.2. ANTIGENICITATEA HORMONILOR ŞI A SUBSTANŢELOR HORMONOIDE

Din punctul de vedere al antigenicităţii lor, deci al capacităţii lor imunogene, hormonii şi substanţele hormonoide pot fi clasificate în trei mari categorii: hormonii proteici, proteidici şi polipeptidici care sînt antigene tipice; hormonii steroizi care au funcţie de haptenă (antigen incomplet); oligopeptidele care deşi în majoritate sînt haptene, uneori pot să fie şi antigene, cînd talia lor moleculară este mai mare de 800. Prin oligopeptide se înţelege o categorie de hormoni care conţin în molecula lor unul pînă la 10 peptide (aminoacizi), deci greutăţile lor moleculare variază între aproximativ 100 şi 1 000; polipeptidele cuprind categoria de substanţe care conţin 11—50 peptide cu *GM* între 1 100 şi 5 000. Proteinele şi substanţele proteidice (complexe proteină-grup neproteic, de exemplu glicoproteidele) aparţin categoriei macropeptidelor care conţin între 51 şi 100 peptide şi au *GM* de 5 000—100 000 sau categoriei megapeptidelor care conţin peste 100 aminoacizi în moleculă şi au *GM* peste 100 000 (tabela 2.4).

Această clasificare atrage atenţia asupra capacităţii antigenice legată de mărimea moleculei peptidice şi anume este de aşteptat ca hormonii polipeptidici şi macropeptidici să fie antigenici, buni imunogeni, iar oligopeptidele să necesite procedee complexe pentru a deveni imunogene. În realitate, această deducţie este corespunzătoare pentru majoritatea substanţelor dar sînt şi excepţii. De exemplu, HCG — o glicoproteidă — este un imunogen slab, iar unele oligopeptide naturale, ca vasopresina, pot fi imunogene.

Un rol important îl are *specificitatea de specie* (tabelele 2.3 şi 2.5). Majoritatea hormonilor polipeptidici şi macropeptidici sînt diferiţi ca structură de hormonii endogeni ai iepurelui, folosit cel mai frecvent pentru imunizare (pentru insulină este folosit cobaiul). Cu toate acestea, exceptînd hormonii proteici, imunizarea cu hormoni glicoproteici hipofizari sau placentari necesită multe insistenţe pentru a obţine antiseruri convenabile.

În legătură cu specificitatea de specie sînt de semnalat avantajele unor comunităţi de structură între unii hormoni umani şi cei ai altor mamifere. Mulţi hormoni macropeptidici umani sînt greu de obţinut. De aceea, pentru obţinerea antiserurilor sînt folosiţi omologii lor izolaţi de la acele mamifere cu care există identitate parţială a secvenţelor de aminoacizi. Insulina porcină care diferă de cea umană numai printr-un singur reziduu peptidic, este curent folosită pentru imunizare dar şi ca trasor radioactiv (numai standardul este uman), deci sistemul de dozare este un sistem mixt: eterolog şi omolog.

Asemănarea structurală dintre TSH şi Pth uman şi hormonii corespunzători bovini a permis dozarea acestor hormoni la om în sisteme mixte sau chiar eterologe. Astăzi, pentru TSH se foloseşte sistem omolog dar pentru Pth se foloseşte în continuare sistem eterolog (bovin). Cînd asemănările structurale între hormonii a două specii sînt plasate în porţiunea aminoterminală (bioactivă) dar anticorpii recunosc porţiunea carboxiterminală unde sînt plasate diferenţele de specie între secvenţele aminoacizilor, atunci folosirea sistemului eterolog nu este posibilă. Un exemplu este calcitonina M (medulară) umană care în porţiunea N-terminală are 7 poziţii comune cu cea porcină, iar în cea C-terminală numai 2 [22]. Unele antiseruri obţinute faţă de TCT porcină care recunosc din întîmplare

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 2.4

Clasificarea hormonilor peptidici umani după numărul de aminoacizi din moleculă

Categoria	Hormonul sau substanța hormonoidă	Nr. resturi aminoacizi	*GM*
Oligopeptide			
1—10 peptide			
GM 100—1 000			
monopeptide	MIT, DIT (mono- și diiod-tirozina)	1	
dipeptide	T_3, T_4	2	
tripeptide	TRH	3	362
tetrapeptide			
pentapeptide			
hexapeptide			
heptapeptide			
octapeptide	oxitocina	8	1007
	angiotensina II		
	vasopresina		
nonapeptide	bradikinina	9	
decapeptide	angiotensina I	10	
	LH/FSH-RF		
Polipeptide			
(11—50 peptide			
GM 1 100—5 000)			
	β-MSH	13	
	SRIF	14	
	gastrina II (porcină)	17	2000
	α-MSH	18	
	secretina (porcină)	27	
	glucagon (porcin)	29	3800
	TCT	32	3700
	colecistokinina-pancreozimina (CCK-PZ)	33	
	ACTH	39	4570
Macropeptide			
(51—100 peptide			
GM 5 000—100 000)			
	Insulina	51	5734
	Pth		8500
	HGH	188	21500
	TSH		25000
	LH		26000
	FSH		30000
Megapeptide			
(> 100 peptide			
GM > 100 000)	Tiroglobulina		600000

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 2,5

Clasificarea hormonilor din punctul de vedere al specificităţii imunologice de specie şi de organ

Sursa	Hormonul	Specificitatea	
		Specie	Organ
Hipotalamus	Releasing-factori	−	±
Epifiză	AVT	−	?
Hipofiză	HGH	+ (primate)	+
	TSH	± (rx cu TSH bovin)	+ (dar şi în placentă)
	ACTH	± (rx cu ACTH porcin)	+
	LH	+ (rx slabe cu	
	FSH	+ omologii ovini)	
	Prolactina	+	
	Oxitocina	−	+
	Vasopresina	−	+
Tiroidă			
	T_3	−	+
	T_4	−	+
	Tiroglobulina (precursor)	−	+
	Tirocalcitonina	±	+
Paratiroidă			
	Parathormon	± (rx cu Pth bovin)	+
Pancreas			
	Insulina	±	+
	Glucagon	±	− (şi enteroglucagon)
Placentă			
	HCG	+	+
	HPL	+	+
CSR + gonade	Steroizi sexuali	−	−
	mineralo- şi glucocorticoizi	−	+

(−) = absenţa specificităţii; (±) = specificitate dominantă pentru un organ, putînd fi prezenţi şi în alte structuri; (+) = specificitate prezentă; (?) = încă incertă; rx = reacţie încrucişată.

porţiunea N-terminală, pot da reacţii încrucişate cu TCT—M umană [22] (tabela 2.6).

Dozele folosite pentru imunizare sînt astfel alese încît să incite formarea anticorpilor, deci să nu fie nici prea mici încît să inducă toleranţa animalelor dar nici prea mari încît să determine fenomenul paraliziei imunologice. Mai trebuie să se ţină seama şi de faptul că unii hormoni umani sînt disponibili în cantităţi foarte mici şi deci sînt preferabile căile de imunizare care asigură o remanenţă sporită. De exemplu, inoculările intradermice multiple folosind preparate înglobate în adjuvanţi permit folosirea unor doze de ordinul zecilor de μg [23]. Mai mult, dozele mici pot avantaja componenta dominantă a unui preparat hormonal nu tocmai pur, cum este cazul multor hormoni de extracţie, în special din hipofiza umană. În aceste situaţii, cantitatea de hormon contaminant conţinută într-o doză mică de preparat este sub doza limită imunogenă.

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 2.6

Comunităţi structurale ale unor hormoni polipeptidici umani cu omologii lor de la alte mamifere

Hormonul	Nr. reziduuri aminoacizi/ moleculă la om	Nr. reziduuri aminoacizi/ moleculă la alte specii	Nr. poziţii aminoacizi comuni cu hormonul uman	Nr. poziţii aminoacizi diferiţi în porţiunea N-terminală	Nr. poziţii aminoacizi diferiţi în porţiunea C-terminală
ACTH	39	porc = 39 oaie = 39 bou = 39	24 (1—24) 24 (1—24) 24 (1—24)	0 0 0	1 5 6
TGT	32	porc = 32 bou = 32 peşte = 32	10 10 16	9 9 7	13 13 9
Gastrina I	17	porc gastrina I = 17	16	1	0
II	17 + SO_3H poziţia 12	oaie gastrina I	16	1	0
		cîine gastrina I	16	1	0
Pth	—	bou = 84 porc = 84	77 comuni bou şi porc	4	3
Insulină	51	porc = 51 bou = 51	50 49		

2.2.3. DETERMINANTELE ANTIGENICE ŞI RELAŢIA STRUCTURĂ BIO- ŞI IMUNOREACTIVĂ

Principala obiecţie adusă sistemelor de dozare radioimunologică este aceea că măsoară porţiuni moleculare imunoactive care pot să nu coincidă cu cele bioactive. În acest sens cîteva întrebări şi-au găsit (sau sînt pe cale să-şi găsească) răspunsul :

— care este porţiunea bioactivă a unei molecule hormonale ?

— în ce zone ale moleculei sînt aşezate grupările imunoactive ?

— cîte grupări imunoactive are fiecare hormon în molecula sa şi cîţi aminoacizi cuprinde o grupare ?

— care este relaţia intramoleculară dintre structura bioactivă şi cea imunoactivă ?

Studiul detaliat al unor hormoni polipeptidici, în special al celor obţinuţi pe cale sintetică, a permis concluzia că porţiunea aminoterminală a lanţului polipeptidic deţine capacităţile hormonale (oxitocina, ACTH) [24, 25, 26]. Această porţiune este fie identică (ACTH), fie foarte asemănătoare (calcitonina, MSH) ca secvenţă de aminoacizi, la multe specii de mamifere inclusiv omul (tabela 2.6).

Dacă considerăm că diferenţele de structură între hormonii diferitelor specii apar mai ales în porţiunea C-terminală a moleculei lor (tabela 2.6), am fi înclinaţi să credem că aici sînt plasate grupările determinante anti-

Scanned with OKEN Scanner

genice. Această porţiune ar asigura individualitatea hormonului, „cartea de vizită" pentru „prezentarea" la celula imunocompetentă care preia informaţia structurală. Într-adevăr, anticorpii faţă de molecula hormonală intactă nu dau reacţii încrucişate cu hormonii altor specii, dacă hormonul cu care au fost inoculate animalele are specificitate strictă de specie (de exemplu HGH) sau dau reacţii încrucişate parţiale, dacă există comunităţi antigenice suficiente (de exemplu insulina). Dar, dacă porţiunea bioactivă este separată de restul moleculei sau este preparată prin sinteză, ca de exemplu secvenţa 1—24 a ACTH, această porţiune, care este cea N-terminală a moleculei intacte, va produce anticorpi care vor reacţiona încrucişat cu hormonii tuturor speciilor care o conţin. Rezultă că şi porţiunea N-terminală bioactivă conţine grupări determinante antigenice. Aspectul acesta are largi implicaţii practice, întrucît antiserurile obţinute prin inocularea moleculei intacte pot favoriza punerea în evidenţă în sistemul de dozare, a fragmentelor hormonal inactive care există în circulaţie. Acesta este cazul dozării radioimunologice a ACTH cu antiseruri care recunosc cu precădere porţiunea C-terminală biologic inactivă.

Studiul numărului şi localizării grupărilor determinante antigenice din moleculele hormonale sau hormonoide este încă la început.

Pentru a trece la analiza zonelor imunoactive şi a situsurilor de combinare este utilă distincţia între *antigenicitate*, sau capacitatea de a induce formarea anticorpilor şi de a reacţiona cu anticorpul şi *specificitatea structurală*, adică acele caracteristici de structură care permit diferenţierea unei substanţe de alta.

La realizarea *antigenicităţii* sau capacităţii imunogene a unei molecule concură factori multipli ca: structura şi natura chimică, orientarea spaţială, secvenţa aminoacizilor de-a lungul polimerului peptidic (în cazul peptidelor), gradul şi modul de torsionare (înspiralare) dar şi specificitatea de specie. Aşadar concură o categorie de proprietăţi care aparţin moleculei inoculate şi o categorie care aparţine relaţiilor moleculare între specii. Menţionăm, în ceea ce priveşte compoziţia chimică, că aminoacizi aromatici ca tirozina, fenilalanina sau histidina cresc antigenitatea moleculei. Studiile cu ajutorul copolimerilor de aminoacizi începute de Landsteiner în 1945 [27] şi amplificate în ultimii ani [28] aduc numeroase informaţii cu privire la structurile participante la activitatea antigenică a unei macromolecule. Capacitatea imunogenă este pusă în evidenţă prin rapiditatea cu care se obţin anticorpii după inocularea la un animal, prin titrul şi afinitatea anticorpilor obţinuţi. De exemplu, HGH şi tiroglobulina sînt foarte bune imunogene.

Distincţia între *specificitatea structurală* a unei molecule şi a alteia asemănătoare cu ea este deseori determinată de deosebiri minore, ca de exemplu diferenţe ale poziţiei cîtorva aminoacizi, ca în cazul diferenţei între insulina, ACTH şi calcitonina de la om şi de la mamifere.

Specificitatea structurală este pusă în evidenţă prin gradul de reactivitate încrucişată a antiserului cu substanţe asemănătoare celei cu care a fost inoculat animalul. În practica dozărilor radio-imunologice gradul de specificitate antigenică este de importanţă fundamentală. Odată creat un sistem de dozare omolog, este necesar să ştim dacă nu avem interferenţe cu alte substanţe hormonale sau nehormonale prezente şi ele în lichidele biologice studiate în cadrul aceleiaşi specii, cum este cazul celor doi gonadotropi hipofizari. Cunoscînd gradul de reacţie încrucişată a anticorpilor cu aceeaşi substanţă hormonală de la alte specii, dacă acesta

Scanned with OKEN Scanner

este suficient, acest inconvenient aparent poate servi la lărgirea sferei de aplicaţie a sistemului de dozare creat pentru dozarea aceluiaşi hormon la o altă (sau alte) specie. Acesta este cazul sistemului de dozare a insulinei cu anti-insulină porcină utilizabil la majoritatea mamiferelor, inclusiv omul, deşi cu unele precauţii (standard omolog).

Nici structura zonelor imunogene nu este mai bine cunoscută decît numărul şi localizarea lor. S-a sugerat existenţa unor *„arii"* sau *„centri"* *imunoactivi* alcătuiţi din mai multe reziduuri de aminoacizi învecinaţi. Suprafaţa lor a fost apreciată la 7 $m\mu^2$ sau 6 —8 $m\mu^2$, prin studii cu ajutorul haptenelor [29, 30].

Fiecare „arie activă" sau determinant antigenic de pe *suprafaţa* unei molecule antigenice poate induce formarea unui anticorp corespunzător acelei zone. Determinarea numărului determinanţilor (adică valenţa antigenului) se face admiţînd că aceleaşi arii care *induc* formarea anticorpului vor şi reacţiona cu el. De aceea s-a stabilit că valenţa antigenului înseamnă numărul de molecule-anticorp cu care reacţionează o singură moleculă de antigen. Necunoscînd structura tuturor determinanţilor unei molecule de antigen, valenţa este dedusă indirect prin studii de precipitare a antigenului cu anticorp în exces. Valorile obţinute sînt numai estimative, de exemplu pentru tiroglobulină se apreciază numărul de valenţă la 40. Se pare că saturarea simultană a unei molecule de antigen cu valenţă mare şi talie mică la toţi centrii activi nu este posibilă datorită unor aspecte ale configuraţiei spaţiale care duc la mascarea unora dintre centrii activi.

Numărul de valenţă pare critic pentru inducerea răspunsului imunitar dar şi pentru realizarea reacţiei de precipitare.

La introducerea în organism a unor substanţe antigenice, răspunsul imunitar iniţiat prin prezenţa antigenului începe prin recunoaşterea sa de către celulele imunocompetente. Acestea vor recunoaşte şi fixa fiecare determinant antigenic (centru activ) cu o anumită imunoglobulină. Odată fixat antigenul printr-un singur determinant, dacă antigenul este polivalent, pentru fiecare alt determinant vor apărea alte imunoglobuline. Rezultă o aglomerare de imunoglobuline la nivelul locului de fixare al antigenului, care duce la endocitoza antigenului.

Un număr redus de arii active de pe suprafaţa unei molecule face ca ele să nu poată induce răspuns imunitar, cu formare de anticorpi. Un antigen monovalent are însă posibilitatea să se fixeze pe suprafaţa membranei limfocitare, blocînd situsurile imunoglobulinelor, ceea ce poate avea un efect opus — imunosupresor.

Haptenele sărace în grupări determinante nu pot induce răspuns imunitar cu formarea anticorpilor decît după cuplarea covalentă cu un purtător antigenic. Ele pot însă să blocheze anticorpii fără să dea reacţii de precipitare — acestea sînt fie haptene simple incomplete sau haptide, fie haptene complexe — , care dau reacţii de precipitare cu anticorpul corespunzător. Printre haptide semnalăm dizaharidele sau compuşi organici simpli (de exemplu hormonii steroizi, aminele biogene, prostaglandinele, nucleotidele ciclice), iar printre haptenele complexe amintim unele oligopeptide, acizii nucleici, unele polizaharide sau lipide [21]. Antigenul şi haptena au capacitatea de a reacţiona specific cu anticorpii corespunzători. În reacţia cu anticorpul intră în joc situsurile de combinare ale antigenului sau haptenei. Studiile asupra structurii acestor situsuri de combinare au dus la unele rezultate abia după anul 1970 şi se pare ca este vorba, cel puţin în cazul unor poliozide bacteriene, de structuri relativ simple.

Scanned with OKEN Scanner

2.3. SERURILE ANTI-HORMONI

Scopul principal al studiului antiserurilor pentru dozări radioimunologice este obținerea acelui antiser care posedă o aviditate excepțională pentru antigenul sau haptena corespunzătoare. Variabilitatea de răspuns a animalelor la aceleași antigene, în aceleași condiții de inoculare, (forma de inoculare, doza, ritmul inoculărilor) face ca asemenea antiseruri să poată fi obținute destul de rar. Multe din lucrările care recomandă scheme de imunizare, bine asigurate statistic, infailibile, sînt considerate simple „anecdote" [31].Morala este că pentru a crește probabilitatea unui răspuns imunitar cu producerea unui antiser adecvat, trebuie să inoculăm un număr mare de animale și să folosim o varietate de strategii în cursul procedurilor de imunizare. Ca o anticipare a capitolelor care urmează, asigurarea că se testează în adevăr un antiser se face în prezența unui bun antigen marcat.

În cursul procesului de obținere a antiserurilor trebuie să ținem seama de unii factori care au o influență certă asupra producției anticorpilor. Acești factori sînt: imunogenul, adjuvantul, animalul folosit pentru imunizare, calea de inoculare, doza și ritmul inoculărilor și al prelevării antiserurilor.

2.3.1. OBȚINEREA ANTISERURILOR — IMUNOGENUL

Prin imunogen se înțelege o substanță antigenică sau un conjugat haptenă-proteină, care inoculat unui animal, induce formarea anticorpilor. În general, peptide cu talii moleculare mai mari de 5 000 (deci macro- și megapeptide) sînt capabile să producă formarea unor anticorpi cu afinitate mare pentru antigenul corespunzător. Oligopeptidele (cu *GM* sub 5 000) sînt imunogene slabe, deși uneori au fost obținute antiseruri cu octa-, nona-, deca- sau dodecapeptide nemodificate. Substanțele nepeptidice ca hormonii steroizi, aminele biogene, nucleotidele ciclice, prostaglandinele și unele oligopeptide, în special cele cu *GM* sub 800, sînt imunogene slabe; ele fac parte din categoria haptenelor. Pentru obținerea antiserurilor, acestea sînt în prealabil cuplate cu o proteină.

Forma de inoculare a substanțelor antigenicc. Substanțele dozabile radioimunologic pot fi produse naturale obținute prin procedee de extracție și purificare sau produse de sinteză. Pentru obținerea antiserurilor sînt folosite ambele categorii, unele substanțe sînt folosite și ca produse naturale și ca produse de sinteză (de exemplu ACTH, vasopresina). Acestea sînt administrate ca molecule intacte sau ca fragmente ale lor: porțiuni beta ale LH, FSH, HCG sau lanțuri polipeptidice (lanțurile A și B ale insulinei).

Puritatea produșilor de extracție este utilă dar nu obligatorie; contaminarea cu substanțe degradate poate avea repercusiuni asupra răspunsului imunitar prin apariția fenomenului de competiție imunologică cu rezultat scăderea titrului față de componenta principală. Anticorpii față de contaminanți pot fi îndepărtați prin absorbția antiserurilor. În preparatele de sinteză pot apărea unele peptide foarte asemănătoare cu substanța de cercetat, zise peptide „greșite" care produc multe dificultăți în obținerea unor antiseruri adecvate, de aceea prezența lor în produsul de sinteză trebuie controlată.

Scanned with OKEN Scanner

Ambele categorii de praparate sînt administrate sub formă solubilă sau ca precipitate insolubile, fără restricţii de pH. S-a arătat că prin conservare în soluţie, unele proteine dau agregate; de exemplu, insulina poate forma dimeri (prin legături necovalente) sau agregate mai mari, care îi cresc antigenicitatea; aspecte similare au fost semnalate pentru HGH conservat în soluţii acide.

S-a observat că în cursul imunizării cu proteine cu greutate moleculară mare, de exemplu tiroglobulina, iodotironinele (T_3, T_4) din molecula sa joacă rol de haptene şi produc anticorpi specifici în afara celor produşi de alte determinante antigenice proprii; acest aspect a fost exploatat pentru obţinerea antiserurilor faţă de aceste dipeptide.

Substanţele antigenice care dau arcuri de precipitare cu antiserurile corespunzătoare pot fi injectate sub forma insolubilă, de complexe antigen-anticorp, obţinute prin imunoelectroforeză [32]. Această metodă permite obţinerea unor antiseruri specifice pornind de la mixturi de antigene care injectate la animal produc antiseruri nespecifice. De pe placa de imunoelectroforeză sînt identificate arcurile care corespund substanţei de cercetat ale cărei caracteristici de migrare electroforetică sînt cunoscute; aceste arcuri decupate, dializate şi apoi omogenizate în adjuvant sînt bune imunogene. Condiţia principală este să se facă inocularea la aceeaşi specie de animal la care au fost obţinute antiserurile nespecifice pentru a evita formarea anticorpilor faţă de IgG complexat în precipitare.

Forma de inoculare a substanţelor neantigenice (haptene). Principalele categorii chimice de substanţe haptenice dozabile radioimunologic sînt peptidele (oligopeptide), steroizii, glucozidele, nucleotidele ciclice şi diferite alte substanţe organice (prostaglandine, unele medicamente etc.).

Pentru a obţine antiseruri, haptenele sînt cuplate în prealabil cu o proteină. Capacitatea imunogenă a proteinei amplifică răspunsul imunitar faţă de haptena cuplată. Numărul mare de substituţii (număr de molecule de haptenă per o moleculă de purtător) este important, deşi nu s-a putut stabili o corelaţie între numărul de substituţii şi titrul (afinitatea şi specificitatea) antiserurilor [33]. Există observaţii care arată contrariul şi anume că, cu cît este mai mic (dar nu oricît de mic) numărul de haptene substituite în molecula de purtător cu atît haptena este mai imunogenă. Aceste date par să fie în acord cu mecanismul preluării informaţiei antigenice de către celulele imunocompetente (vezi § 1.4.3), aglomerarea determinantelor antigenice pe o suprafaţă mică ducînd la mascarea lor reciprocă. Specificitatea antiserurilor obţinute pare dependentă şi de orientarea haptenei faţă de molecula proteică, anticorpul avînd tendinţa să recunoască acea parte a moleculei de haptenă care este plasată la distanţa cea mai mare de locul de conjugare cu proteina [31]. De aceea au fost propuse metode care să permită alegerea locului de legare a haptenei pe proteină în scopul obţinerii unei specificităţi anumite.

Deseori sînt inoculate molecule identice cu cele proprii ale animalului (vasopresina, releasing factori ai gonadotrofinelor, somatostatină) sau puţin diferite (insulina, gastrina). De aceea ar fi de aşteptat unele inconveniente, printre acestea s-ar putea observa absenţa răspunsului imunitar, dar probabil inocularea cu adjuvanţi ajută ruperea toleranţei imunitare faţă de aceste substanţe; în plus, titrul anticorpilor ar putea fi redus prin saturarea lor cu substanţa endogenă. De exemplu, pentru obţinerea serurilor antitestosteronă se recomandă folosirea iepurilor femele şi absorbţia antiserurilor obţinute cu cărbune pentru îndepărtarea steroizilor endogeni.

Scanned with OKEN Scanner

De remarcat că interacţiunea *in vivo* dintre anticorp şi substanţa endogenă corespunzătoare este prea puţin studiată.

Metodologia cuplării haptenelor cu o moleculă purtătoare are în vedere considerente care privesc haptena şi anume natura şi structura chimică, zonele bioactive şi cele care îi conferă specificitatea şi considerente care privesc molecula proteică : prezenţa locurilor de legare cu haptena şi capacităţile sale imunogene. Legătura chimică dintre haptenă şi suportul proteic trebuie să fie o legătură de tip covalent (legătură chimică ireversibilă), altfel apar disocieri ionice şi imunizarea faţă de haptenă este suprimată. Tehnicile de sinteză a conjugatelor haptenă-proteină au la bază lucrarea lui Erlanger şi colab. din anul 1957 [34]. Numeroasele lucrări care au fost publicate ulterior privesc numai modificări şi adaptări în funcţie de natura şi structura chimică a haptenei şi de specificitatea scontată.

Sinteza conjugatelor haptenă-proteină. Metodologia obţinerii antiserurilor cu ajutorul conjugatelor substanţă neantigenică-antigen se bazează pe descoperirea conceptului de haptenă de către Landsteiner (1932, 1933, 1945). Acest concept a fost aplicat prima oară în scopul obţinerii anticorpilor de către Clutton (1938), care a încercat să obţină anticorpi antitiroxină (T_4) prin conjugarea 3-5-diiodotironinei (T_2) cu o proteină urmată de iodurarea conjugatului. Anticorpii obţinuţi au reacţionat specific cu diiodotironina, nu şi cu T_4. Aceste date au servit ulterior pentru prepararea conjugatelor de steroizi, oligopeptide şi de alte substanţe cu proteine. Progresele în acest domeniu au fost facilitate de observaţiile cu privire la apariţia legăturilor peptidice prin condensare cu pierdere de apă în prezenţa unor substanţe de tipul carbodiimidelor [35, 36]. Procesul de haptenizare constă din cuplarea unor substanţe simple pe o proteină suport sau pe o polipeptidă, realizîndu-se astfel un antigen de „sinteză" — un conjugat. Grupările reactive ale moleculei suport (sau purtătoare) sînt grupările amino sau grupările carboxil (şi grupările SH pot fi reactive). Grupările NH_2 reacţionează cu COOH în prezenţa agenţilor acilanţi : acidul clorhidric, azidă, anhidridă, izo- sau tiocianatul, aldehide, derivaţi clor- sau fluor-benzenici etc. Grupările COOH reacţionează cu NH_2 în prezenţa agenţilor de condensare : carbodimide sau cloroformiat de etil [37].

Alegerea proteinei de legare este dictată de prezenţa grupărilor amino-ε ale resturilor de lizină şi de capacităţile sale imunogene. Cel mai frecvent este folosită serumalbumina bovină, care conţine 59 de grupări lizină-amino-ε şi în plus o grupare amino-α. Nu toate aceste grupări sînt accesibile conjugării, multe din ele fiind steric mascate, iar cele care sînt disponibile prezintă orientări variate pe suprafaţa moleculei, ceea ce are drept consecinţă eterogenitatea afinităţii antiserurilor [33]. Pentru conjugarea haptenelor sînt folosite şi alte proteine naturale, ca serumalbumina umană sau de iepure, gamaglobulina serică de porc, ovalbumina, tiroglobulina bovină, hemocianina. Folosirea ca suport a homopolimerilor sintetici, de exemplu poli-L-lizina [38], care au o structură regulată, favorizează obţinerea unor antiseruri cu afinitate mai omogenă dar imunogenitatea polimerilor este mai slabă, în special pentru steroizi.

Metoda de cuplare a haptenei cu grupările funcţionale ale proteinei (NH_2, COOH) este dictată de grupările funcţionale disponibile ale haptenei (COOH, NH_2, OH, cetone, aldehide, SH).

Agenţii de cuplare care au intrat în practica curentă sînt carbodiimidele [39]. Cu ajutorul acestor substanţe se pot obţine cuplări covalente

prin legături amidă, ester, tioester sau fosfoester. Grupările amino şi carboxil sînt cel mai uşor de introdus pe un lanţ proteic. Sinteza poate fi restrictivă cu formarea unei legături amidice specifică deoarece legăturile peptidice apar prin condensare cu pierderea apei între doi aminoacizi dintre care unul conţine numai o grupare carboxil liberă şi celălalt numai o grupare amino liberă.

Mecanismul formării legăturii peptidice în prezenţa carbodiimidei implică mai multe trepte cu apariţia unor compuşi intermediari [40].

Condiţiile reacţiei dintre haptenă şi proteină în prezenţa carbodiimidei depind de proprietăţile ligandului (solubilitate, pH etc.) şi de aceea trebuie optimizate pentru fiecare tip de haptenă.

Conjugate peptid-proteină. În general, oligopeptidele (1—10 peptide/moleculă) sînt imunogene slabe. Cu toate acestea, au fost obţinute antiseruri convenabile în ceea ce priveşte specificitatea, titrul şi afinitatea pentru antigen cu unele octa-, nona- sau decapeptide. De exemplu, au fost obţinute antiseruri pentru oxitocină, vasopresină, angiotensină II (octapeptide) sau angiotensină I şi LH/FSH—RF (decapeptide) prin injectarea la animal a peptidei absorbite pe particule de polivinil-pirolidonă sau de cărbune [26, 41—44].

Se poate conchide provizoriu că talia moleculară de 800 ar putea reprezenta mărimea limită pentru obţinerea antiserurilor cu haptene peptidice necuplate pe suport proteic.

În scopul obţinerii antiserurilor pentru octa-, nona- şi decapeptide diferitele grupuri de cercetare folosesc fie absorbţie pe particule inerte, fie cuplarea pe suport proteic sau ambele. Peptidele mai mici sînt în mod invariabil cuplate cu o proteină sau cu un polimer de L-lizină. Precipitatele obţinute prin reacţia de conjugare cu carbodiimidă sînt inoculate animalelor după prealabila înglobare într-un adjuvant.

Metodele uzuale de conjugare a oligopeptidelor cu proteina suport sînt reacţia cu anhidridă mixtă [45], cu benzidină (reacţia diazo) [46], reacţia cu carbodiimidă sau cu glutaraldehidă.

Un exemplu de formare a imunogenului cu o tripeptidă este conjugatul proteină-factor de eliberare al tireotropului [(TRH = thyreotrop

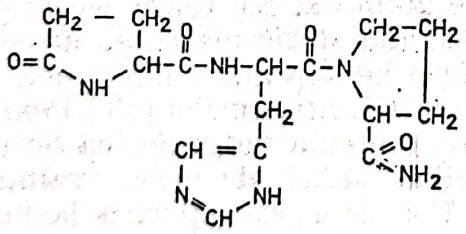


Fig. 2.5. — Formula TRH-l-piroglutamil-1-histidil-1-prolinamidă.

releasing hormone sau factor). TRH (sau TRF) este o tripeptidă cu $GM = 362$, alcătuită din aminoacizii glutamină, histidină şi prolină. Ancorarea pe proteină se face la reziduul histidină [46, 47] (fig. 2.5).

Conjugate steroid-proteină. Talia moleculară a hormonilor steroizi ($GM \simeq 300$) (fig. 2.6 şi 2.7) aproximează mărimea moleculară a unei tripeptide (exemplu TRH cu $GM = 362$). Structuri chimice organizate

cu astfel de mărimi moleculare corespund ca mărime (suprafață) locurilor haptenice ale unui antigen, care intră în reacție cu situsul de legare al unui anticorp specific. Această interacțiune între mici cantități din doi reactivi — locurile haptenice (de combinare) ale antigenului și locurile de legare ale anticorpului — reprezintă baza moleculară a dozărilor radioimunologice. Structurile chimice cu greutate moleculară sub cea a unei octapeptide

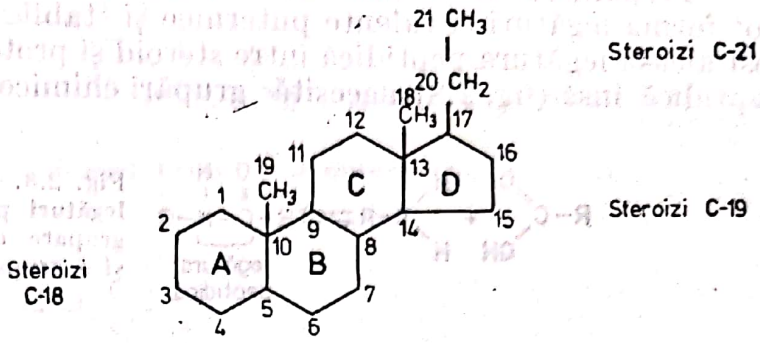
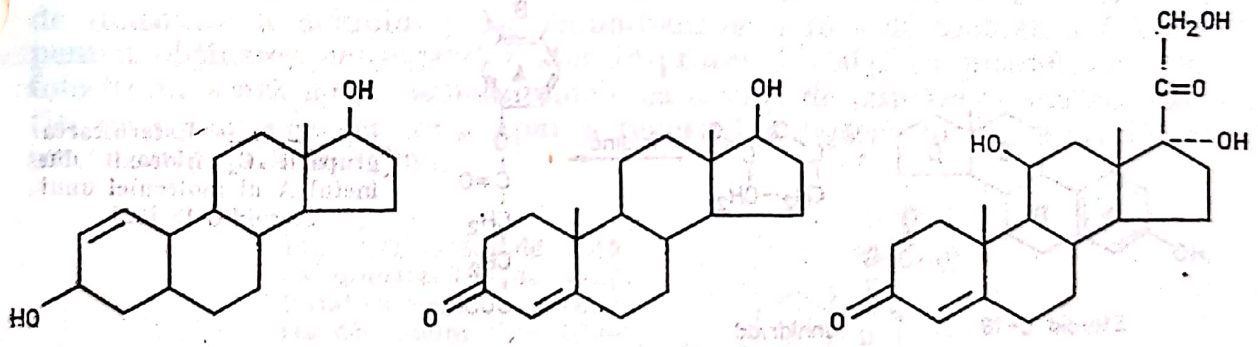


Fig. 2.6. — Formula de bază a hormonilor steroizi. Steroizi C-18: hormoni estrogeni; steroizi C-19: hormoni androgeni; steroizi C_{21}: hormonii corticoizi.

(deci *GM* sub aproximativ 800) nu sînt imunogene prin metodele actuale; inițierea formării anticorpilor este realizată prin conjugarea lor cu molecule proteice mari.

Studii asupra modalităților de antigenicizare a hormonilor steroizi în scopul obținerii unor antihormoni au fost efectuate cu cîțiva ani înainte de publicarea principiului dozărilor radioimunologice. În lucrările publicate de două grupuri de cercetători între anii 1957 și 1959 [34, 48] au fost puse bazele metodologice ale cuplării unei substanțe steroide cu o proteină purtătoare.



Estradiol = E_2 = 1,3,5(10) – trien – 3,17β – diol

Testosteronă = T = 17β – hidroxi – androst – 4 en – 3-onă

Cortizol = compus F = hidrocortizonă 11β,17α,21 – trihidroxi – pregn – 4 – en – 3, 20 – dionă

a b c

Fig. 2.7. — Exemple de steroizi C-18 (a), C-19 (b) și C-21 (c).

Prepararea conjugatelor steroid-proteină necesită analiza stabilității locurilor posibile de legare în îndeplinirea funcțiilor hormonale specifice. Hormonii steroizi naturali conțin grupări cetonice și grupări hidroxil, ambele implicate în mecanismele efectelor hormonale. Modificări chimice minore la nivelul acestor grupări au drept consecință schimbări profunde

Scanned with OKEN Scanner

ale activităţii hormonale. De exemplu, înlocuirea grupării hidroxil la C-17 din molecula de testosteronă cu o grupare cetonică duce la formarea androstendionei. Deşi integritatea acestor mici grupări este atît de necesară, totuşi nu s-a ţinut seama de acest fapt decît la prepararea antiserurilor pentru alte scopuri decît cel al dozărilor radioimunologice [49]. Dimpotrivă, tocmai aceste grupări au fost folosite pentru a realiza treapta intermediară în prepararea conjugatului steroid-proteină.

Prepararea derivaţilor de steroizi. Grupările hidroxil şi cetonice nu pot forma legături covalente puternice şi stabile cu o proteină, de aceea a fost aleasă legătura peptidică între steroid şi proteina purtătoare. Legătura peptidică însă (fig. 2.8) necesită grupări chimice reactive, carboxil, amino

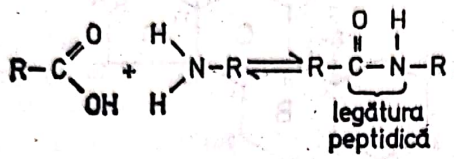


Fig. 2.8. — Formarea unei legături peptidice între o grupare carboxil (COOH) şi o grupare amino (NH_2).

sau COOCl, NCO etc. [50], pe care molecula steroizilor naturali neconjugaţi nu le posedă, spre deosebire de cei conjugaţi, de exemplu, cu acid glucuronic, care au gruparea carboxil.

Proteinele se vor lega fie cu o grupare amino, fie cu o grupare carboxil la unul din aceste puncte de conjugare, transformat chimic pentru a intra în reacţie cu proteina. Metoda chimică pentru obţinerea derivaţilor este aleasă în funcţie de gruparea stabilită pentru ancorarea pe proteină. Pentru gruparea *hidroxil* este folosită metoda *esterificării selective* cu anhidridă succinică (fig. 2.9) a unei anumite grupări hidroxil, care este cea mai specifică, aceasta implicînd restricţii de durată, temperatură şi concentraţie a reactivilor [51].

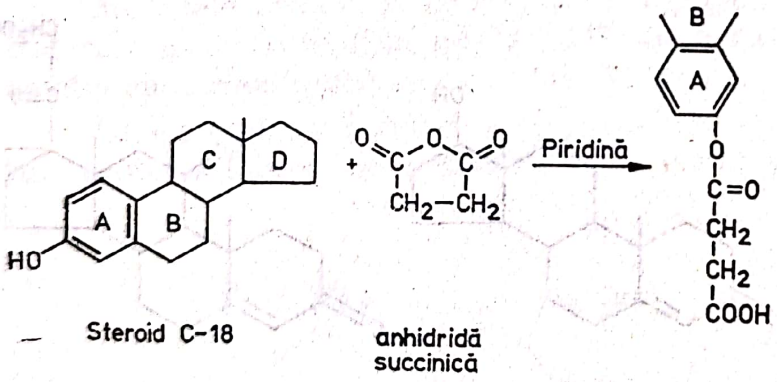


Fig. 2.9. — Esterificarea grupării C_3 hidroxil din inelul A al moleculei unui steroid C-18 [52].

Gruparea *cetonică* este folosită ca loc de ancorare a proteinei după formarea la acest nivel a derivaţilor oximă, şi anume O-carboximetiloximă (fig. 2.10).

Reacţia grupării cetonice cu acidul amino-oxiacetic este mai intensă cînd carbonii vecini sînt nesaturaţi [51]. Derivaţii cloruraţi rezultă din reacţia grupării hidroxil a steroidului cu clorura de carboxil şi se prepară prin tratarea steroidului cu fosgen (PCl_5) (fig. 2.11) [51].

Alături de derivaţii cloruraţi, hemisuccinaţi şi oximă, pentru conjugarea cu proteine mai sînt folosiţi şi derivaţi tiol [53].

Cuplarea covalentă a derivaţilor de steroizi cu proteina are loc prin reacţia dintre gruparea reactivă creată, de exemplu acidă a steroidului cu

Scanned with OKEN Scanner

gruparea ε-amino(bazică) a lizinei din proteină. Proteina folosită cel mai frecvent pentru conjugare este serumalbumina bovină. Polimerii lizinei nu par buni imunogeni în cazul conjugării lor cu steroizii [39]. Sînt puţin studiate influenţele proteinei de legare asupra calităţii antiserurilor. Proteina purtătoare pare să fie însă influenţată în cursul procedeelor

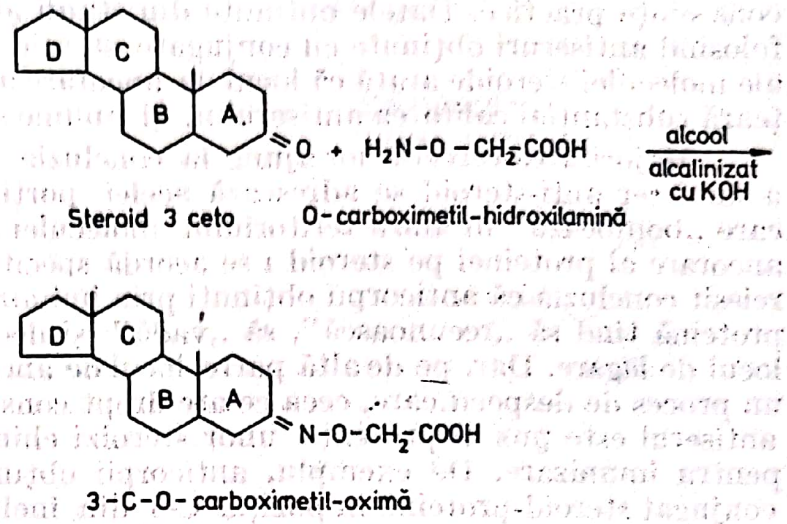


Fig. 2.10. — Formarea O-carboximetil-oximei la C-3 din inelul A al unui steroid C-19 prin reacţia dintre gruparea ceto de la C-3 cu O-carboximetil-hidroxilamina în prezenţa unei baze (alcool alcalinizat cu KOH sau piridină) [51].

de conjugare prin condensare cu carbodiimidă, observîndu-se apariţia unor legături intramoleculare, de aceea unii autori preferă metoda cu anhidridă mixtă [33].

Metodele de conjugare a derivatului steroidian cu proteina purtătoare includ metodele folosite de Erlanger [34], şi anume reacţia Schotten-Bauman pentru derivaţii cloruraţi sau reacţia cu anhidridă mixtă, folosind izobutil-cloroformiat pentru derivaţii acidului carboxilic. Reacţia de diazotare a acidului *para*-amino-benzoic a fost de asemenea folosită pentru obţinerea conjugatelor steroid-proteină [50]. În ultimii ani sînt folosite pe scară largă carbodiimidele ca agenţi de cuplare în cursul reacţiei de condensare dintre gruparea reactivă a ligandului şi grupările ε-amino lizină ale proteinei.

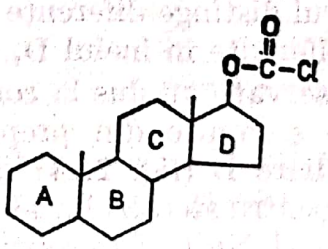


Fig. 2.11. — Steroid C-19 cu grupare OH în C-17 tratat cu fosgen, cu formarea derivatului clorocarbonat (cloroformiat) al steroidului.

Conjugatele derivat steroidian-proteină izolate prin dializă de substanţele din amestecul de reacţie sînt supuse analizei pentru aprecierea raportului molar steroid/proteină şi pentru calitatea cuplării. Raportul molar steroid/proteină introdus în reacţie este de aproximativ 500, iar cel final variază în limite de 15—35. Conjugate steroid-proteină cu raport molar sub 10 nu sînt bune imunogene [51]. Ţinînd seama de mecanismele transferului informaţiei antigenului după apariţia în organism, legat de gradul de aglomerare de molecule de steroid pe o singură moleculă de proteină, se naşte întrebarea dacă nu există şi o limită superioară a numărului de haptene steroide alocate unei molecule suport.

Scanned with OKEN Scanner

Caracterizarea conjugatelor steroid-proteină se face prin metodele uzuale, ca spectroscopia în UV, în infraroşu, analiza mobilităţii electroforetice etc. Experienţa dobîndită în ultima decadă prin folosirea serurilor anti-steroizi pentru dozarea radioimunologică a hormonilor steroizi şi prin studiile de reactivitate încrucişată a fiecărui antiser cu o varietate de steroizi înrudiţi şi neînrudiţi permite unele concluzii metodologice cu consecinţe practice. Datele obţinute din studii ale reactivităţii încrucişate folosind antiseruri obţinute cu conjugate steroid-proteină în diferite poziţii ale moleculei steroide arată că locul de ancorare al proteinei suport influenţează substanţial calitatea antiserului, şi anume specificitatea lui.

Majoritatea cercetărilor ajung la concluzia că specificitatea maximă a unui ser anti-steroid se adresează acelei porţiuni a moleculei steroide care „bombează" în afara teritoriului moleculei suport pe cînd locului de ancorare al proteinei pe steroid i se acordă specificitate minimă. De aici a reieşit concluzia că anticorpii obţinuţi prin imunizare cu conjugat steroid-proteină tind să „recunoască", să „vadă" (şi deci să lege) la distanţă de locul de legare. Dar, pe de altă parte, locul de ancorare al suportului suferă un proces de despecificare, ceea ce are drept consecinţă unele confuzii cînd antiserul este pus în prezenţa unor steroizi chimic înrudiţi cu cel folosit pentru imunizare. De exemplu, anticorpii obţinuţi prin injectarea unui conjugat steroid-proteină în poziţia C-3 din inelul A al unui steroid C-19 Δ^4-3-ceto, prezintă specificitate maximă pentru inelul D şi minimă pentru inelul A, de aceea aceşti anticorpi reacţionează specific cu steroizii C-19-5α corespunzători, nu însă şi cu steroizii C-21 Δ^4-3-ceto, cu toate că au inelul A identic cu al testosteronei (fig. 2.6, 2.7, 2.12, 2.13). Acesta este, de exemplu cazul serului anti-testosteron-3-carboximetil-oximă—proteină, care poate face distincţia între testosteronă şi progesteronă, corticosteronă, cortizol şi cortizonă, cu care prezintă diferenţe structurale în inelul D, nu mai sesizează însă diferenţele din inelul A dintre testosteronă şi steroizi C-19-5α sau Δ^5-3β-ol (fig. 2.7, 2.12, 2.13).

Dacă locul de conjugare este fixat în poziţia C-17 din inelul D al testosteronei, antiserul obţinut reacţionează încrucişat cu o diversitate de steroizi Δ^4-3-ceto confundînd testosterona cu epitestosterona, androstendiona şi chiar cu un steroid C-21, ca progesterona [47]. Deci, în aceste condiţii, antiserul distinge diferenţe structurale minore în inelul A, dar nu mai sesizează diferenţe în inelul D, inelul de conjugare.

Aceste observaţii au dus la concluzia că conjugarea la inelele A şi D trebuie evitată şi multe din preparatele steroid-proteină conjugate la inelele intermediare B (fig. 2.14) sau C au permis obţinerea unor antiseruri specifice pentru steroizi înrudiţi, ca de exemplu : estradiolul, estrona şi estriolul [47, 53]. Nu toţi steroizii se supun însă acestei reguli, deoarece imunizarea cu conjugate la inelele B şi C ale testosteronei nu a favorizat obţinerea unor antiseruri mai specifice decît cele obţinute cu conjugate în poziţia C-3 din inelul A al testosteronei [33].

Un alt aspect important este acela că antiserurile preparate cu conjugate de steroizi cu structură mai complexă (care au mai multe grupări active) fac greu distincţia între aceşti steroizi şi steroizi înrudiţi, cărora le lipseşte o grupare activă [50].

Grupările metabolic active — hidroxil şi ceto — este preferabil să fie lăsate intacte pentru a se putea reliefa în afara ariei proteinei de conju-

Scanned with OKEN Scanner

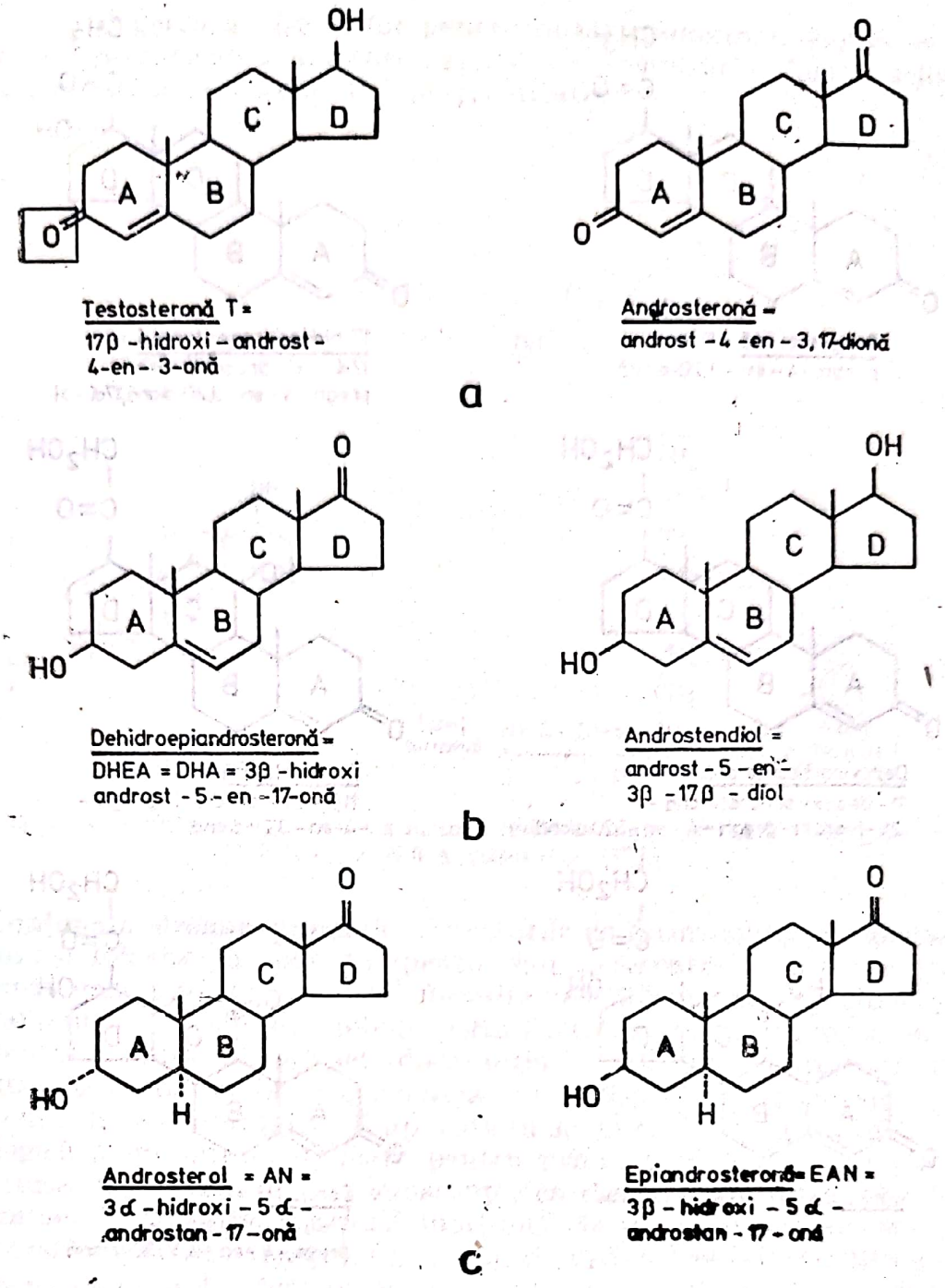


Fig. 2.12. — Steroizi C-19 *a*) steroizi Δ^4-3-ceto ; *b*) steroizi Δ^5-3β-ol ; *c*) steroizi 5α ; |____| = locul de ancorare al proteinei suport.

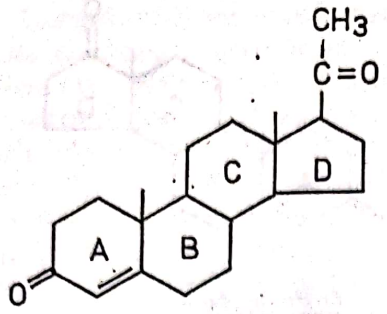
gare şi astfel să-şi exercite influenţa lor ca grupări determinante în interacţiunea cu anticorpul [51].

Unele studii ale reactivităţii încrucişate a serurilor antiprogesteronă obţinute cu conjugate la inelele A, B, C sau D au arătat că specificitatea maximă a fost obţinută cu antiseruri faţă de conjugate la inelul C (poziţia C-11) ; aceşti anticorpi au fost atît de selectivi încît treptele de prepurificare cromatografică nu mai sînt necesare [45, 54, 55, 56].

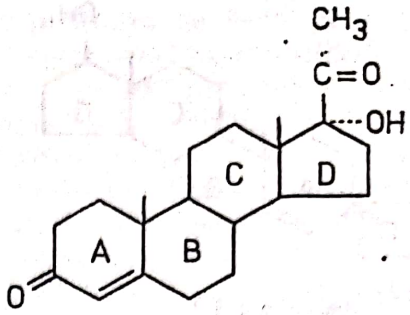
Rezultă că unele reguli şi concluzii sînt deductibile, deşi provizorii :

— alegerea metodei de formare a derivaţilor steroidici destinaţi conjugării este în funcţie de poziţia de ancorare la proteina suport ;

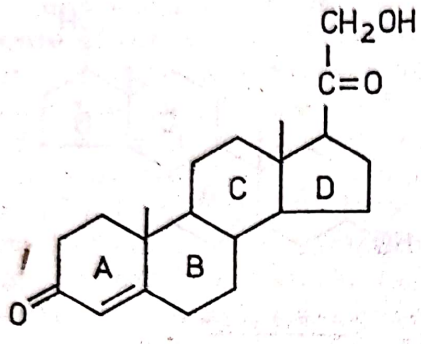
Scanned with OKEN Scanner



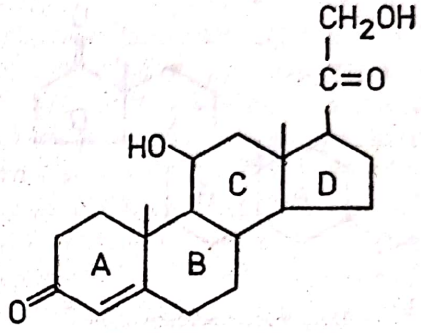
Progesteronă = PG =
progn.-4-en-3,20-dionă



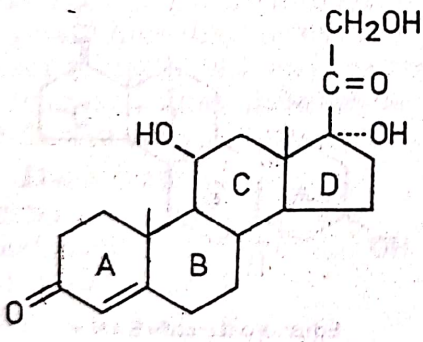
17-hidroxiprogesteronă =
17α-OH-progesterona =
pregn-4-en-3,20-dionă,17α-ol



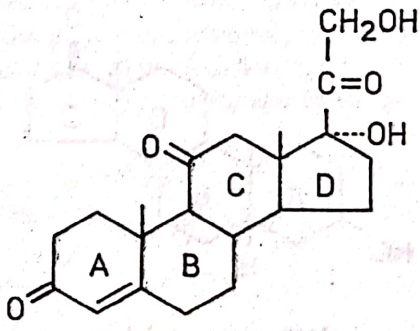
Dezoxicorticosteronă = DOC =
11-dezoxicorticosteronă-
21-hidroxi-pregn-4-en-3,20-dionă



Corticosteronă = B =
11β-21-dihidroxi-pregn-
-4-en-3,20-dionă



Cortizol = F = hidroxicortizonă =
11β, 17α, 21 — trihidroxi-
pregn-4en-3,20-dionă



Cortizon = E =
17α, 21-dihidroxi-
pregn-4-en-3, 11, 20-trionă

Fig. 2.13. — Steroizi C-21 : Δ^4-3 ceto.

— reactivii folosiți în procesul de conjugare a derivatului steroid cu proteina pot influența structura proteinei suport;

— numărul reziduurilor de steroid alocat unei molecule de proteină nu poate fi mai mic de 10, iar tehnicile actuale nu sînt capabile să depășească un număr limită [35, 36], de aceea nu știm dacă există o limită superioară optimală;

— la alegerea locurilor de conjugare se ține seama că grupările active cele mai importante trebuie menajate și că anticorpul are tendința la „prezbiții", adică vede bine la distanță de locul de conjugare, dar este „miop" în ceea ce privește locul de conjugare însuși;

Scanned with OKEN Scanner

— la alegerea antiserurilor pentru dozări radioimunologice se ţine seama de specificitatea acestora, ştiind că antiserurile foarte selective permit simplificarea fazelor de prepurificare.

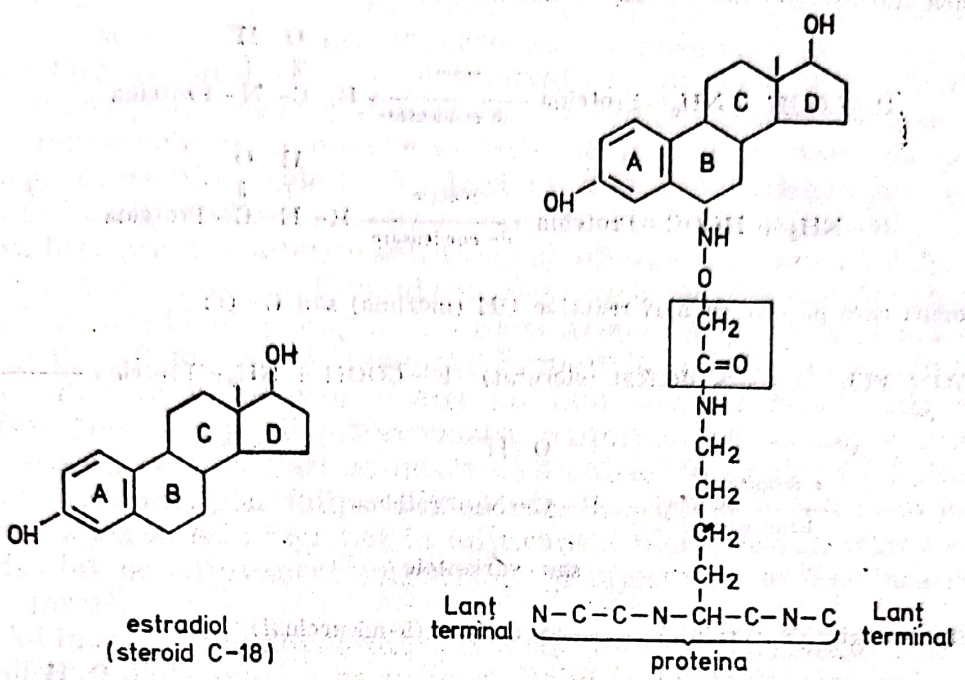


Fig. 2.14. — Formula schematică a imunogenului estradiol-proteină. Conjugare în poziţia C-6 a inelului B [57].

Conjugate droguri-proteină. Cercetările de farmacologie a substanţelor chimice folosite în scop terapeutic sau „recreativ", care au primit denumirea generală de „droguri" necesită metode precise, specifice şi de mare randament. Astfel de metode permit supravegherea (monitorizarea) tratamentului, rata absorbţiei, distribuţia, localizarea şi excreţia unui drog, metabolismul şi farmacocinetica lui . Metodele clasice sînt prea puţin sensibile pentru a putea fi aplicate în scopuri clinice. Dozarea radioimunologică a drogurilor, aplicată pentru prima oară digitoxinei [58], a fost extinsă la dozarea multor substanţe, ca de exemplu prostaglandine, amfetamine, barbiturice, alcaloizi morfinici, derivaţi ai acidului lisergic. Toate aceste substanţe aparţin, din punct de vedere imunologic, categoriei haptidelor, adică a haptenelor simple, obţinerea antiserurilor necesitînd aplicarea metodelor de legare covalentă cu o proteină.

Din punctul de vedere al posibilităţilor de conjugare distingem trei categorii de substanţe. O categorie de substanţe conţine grupări reactive la nivelul cărora se pot realiza legături peptidice directe, altele necesită formarea unor derivaţi şi unele substanţe fără grupări reactive. Grupări NH_2 prezente în molecula amfetaminelor sau grupări COOH prezente în molecula barbituricelor şi a prostaglandinelor sînt utilizabile pentru conjugarea cu o proteină prin una din metodele folosite pentru steroizi [34, 59]. Alte substanţe conţin grupări reactive OH sau C=O utile pentru formarea unor *derivaţi* (ca şi în cazul steroizilor), care la rîndul lor formează legăturile peptidice cu reziduurile lizină ale proteinei. Drogurile lipsite de grupări reactive sînt înlocuite cu congeneri ai lor (de exemplu metaboliţi) cu care prezintă mari asemănări structurale [60, 61] (tabela 2.7).

TABELA 2.7

Căile uzuale pentru prepararea conjugatelor drog-proteină (R = osatura chimică a drogului)

I. Droguri care posedă grupări reactive —COOH (barbiturice, prostaglandine, derivaţi ai acidului lisergic) sau $-NH_2$ (amfetaminele):

$$R-COOH + NH_2-Proteina \xrightarrow[\text{de condensare}]{\text{reacţie}} R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\overset{\overset{H}{|}}{N}-Proteina$$

$$R-NH_2 + HOOC-Proteina \xrightarrow[\text{de condensare}]{\text{reacţie}} R-\overset{\overset{H}{|}}{N}-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-Proteina$$

II. Droguri care posedă grupări reactive OH (morfina) sau C=O:

$$R-OH + PCl_5 \longrightarrow \text{derivat (clorurat)} - R-COOH + NH_2-Proteina \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[\text{Baumann}]{\text{r. Schotten-}} \text{derivat } R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\overset{\overset{H}{|}}{N}-Proteina$$

sau variantele

$$R-OH + \text{anhidridă succinică} \longrightarrow \text{derivat (hemisuccinat)}$$

$$R-COOH + NH_2-Proteina \xrightarrow[\text{Baumann}]{\text{r. Schotten-}} \text{derivat (succinat)} \longrightarrow R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\overset{\overset{H}{|}}{N}-Proteina$$

$$R-C=O + \text{Carboximetil-hidroxilamină} \longrightarrow R-COOH + NH_2-Proteina \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[\text{sau cu carbodlimidă}]{\text{Condensare cu anhidridă mixtă}} R-\overset{\overset{H}{|}}{N}-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-Proteina$$

III. Droguri care nu posedă nici o grupare reactivă: fentoinele (difenil-hidantoina) — înlocuirea drogului cu un „congener", de exemplu un metabolit, chimic foarte asemănător şi care conţine grupări reactive.

Raportul molar haptenă/proteină obţinut cu diferite droguri şi prin multe metode variază în limite largi, de la 3 la aproape 100. Unele observaţii par să susţină că numărul mic de reziduuri haptenice favorizează imunogenitatea conjugatelor [62], dar acest aspect nu este suficient studiat.

2.3.2. IMUNOPOTENŢAREA — ADJUVANŢII

Preparatele imunogene, substanţe antigenice sau conjugate haptenă-proteină sînt inoculate animalelor de experienţă pentru obţinerea antiserurilor. Pentru dozările radioimunologice sînt necesare antiseruri cu titru înalt, cu afinitate mare şi cît mai specifice. Pentru realizarea acestui deziderat trebuie ajutat răspunsul imunitar al animalelor injectate. Lucrările lui Freund (1951) [63] atrag atenţia asupra posibilităţilor de potenţare a răspunsului imunitar şi aduc ca argument rezultatele obţinute prin înglobarea antigenului într-un amestec de ulei mineral şi lanolină, care conţine în

Scanned with OKEN Scanner

suspensie micobacterii omorîte. De atunci au fost experimentate diferite combinaţii imunopotenţatoare şi au fost publicate multe studii cu privire la modul şi locul de stimulare al răspunsului imun prin adjuvanţi, modul de administrare etc.

Se înţelege, în general , prin adjuvant orice agent care acţionează nespecific pentru a creşte răspunsul imun la un antigen specific [64].

Se consideră că antigenele care sînt capabile să provoace răspuns imunitar fără ajutorul adjuvanţilor posedă propria lor adjuvanticitate şi în mod convenţional au fost numite antigene imunogene. Spre deosebire de acestea, antigenele neimunogene se pare că produc o stare de paralizie imunologică specifică (toleranţă) dacă nu sînt polimerizate sau dacă nu li se adaugă adjuvanticitatea extrinsecă a altor substanţe [64].

Au fost propuse diferite substanţe şi amestecuri pentru a fi folosite ca adjuvanţi. Adjuvantul tip Freund complet este astăzi disponibil comercial şi este alcătuit din 17 părţi Bayol F, 3 părţi Arlacel A şi bacili Koch omorîţi şi uscaţi 0,5—2 mg/ml. Adjuvantul Freund incomplet nu conţine micobacterii. Printre adjuvanţii lichizi au mai fost experimentaţi alaunul precipitat pentru injecţii intravenoase, palmitat sau alcool, vitamina A, iar printre cei corpusculari amintim particulele de siliciu, de hidroxid de aluminiu, cărbune, polivinilpirolidonă etc. Antigenul, solubil sau insolubil în soluţie apoasă, este înglobat în adjuvantul uleios sau în forma solubilă este adsorbit pe adjuvantul corpuscular şi injectarea se face sub una din aceste forme.

Tot în scopul imunopotenţării mai sînt folosite virusurile sau micobacteriile inoculate separat de antigen. Rolul factorilor timici, polipeptidici — timozina, sau sterolici — timosterina nu a fost suficient explorat [65].

Modul în care este influenţat răspunsul imunitar prin adjuvanţi pare să fie diferit în funcţie de tipul de adjuvant. Virusurile ar putea acţiona prin încorporarea sau transportul determinantelor haptenice [66]. Ceilalţi adjuvanţi pot acţiona la diferitele nivele de interacţiune ale antigenului cu sistemul imunitar şi în cursul diferitelor evenimente ale acestei interacţiuni, incluzînd acţiuni la nivel de membrane celulare, proliferare şi diferenţiere celulară, interacţiuni tip „feed-back" pozitiv şi negativ, toate avînd ca rezultat culminant producerea anticorpilor [66]. Deşi locul de acţiune este prea puţin cunoscut, unele date arată totuşi că vitamina A influenţează răspunsul umoral [66]

Nu există suficiente date cu privire la momentul optim al administrării adjuvanţilor. Cel mai frecvent, antigenul este administrat odată cu adjuvantul în care este înglobat (adjuvant tip Freund) sau pe care este absorbit (adjuvanţi corpusculari). Uneori, simultan, în alte locuri se injectează suspensii de virusuri [23] sau, alteori, animalul este pregătit înainte cu 30 de zile de administrarea antigenului, cu o doză de micobacterii [59]. Adjuvantul tip Freund complet este util numai la prima inoculare a antigenului, pentru inoculările de rapel fiind suficient adjuvantul incomplet.

2.3.3. CĂILE DE IMUNIZARE, DOZA, RITMUL INOCULĂRILOR ŞI SPECIA DE ANIMALE

Orice cale de inoculare este bună dacă în forma în care este administrat antigenul se pot asigura accesul larg al grupărilor determinante la sistemul limfoid şi remanenţa adecvată a antigenului în organism. Căile

Scanned with OKEN Scanner

intravenoasă, subcutanată, intramusculară, intraperitoneală, intradermică şi percutană sînt cele folosite încă de la începuturile microbiologiei şi imunologiei. În ultimele două decade au fost găsite căi mai eficiente decît cele intradermice : intraplantar, în teaca digitală, sau intraganglionar [67] sau chiar în ventricolul lateral cerebral [68, 69]. În ultimii ani a dobîndit mult credit metoda injecţiilor intradermice multiple [23] eficientă cu doze minime de antigen. Fiecare din aceste căi de inoculare are avantaje şi dezavantaje (tabela 2.8). Căile intraplantare sînt greu suportate

TABELA 2.8

Căi şi forme de inoculare a imunogenului pentru obţinerea antiserurilor aplicabile în radioimunoanaliză

Calea de inoculare	Forma de administrare a imunogenului	Avantaje/dezavantaje	Rezultate
intravenos	solubilă	metabolizare rapidă, risc de şoc la rapel	mediocre
intraperitoneal	adsorbit pe microparticule	metabolizare rapidă	mediocre
subcutanat	inglobat în adjuvant	—	mediocre
intramuscular		—	bune
intraplantar		dureros pentru animal	bune
intraganglionar		necesită intervenţie chirurgicală, ganglionii se pot necroza	bune
intrasplenic		necesită deschiderea chirurgicală a abdomenului	foarte bune
intradermic		animalele suportă bine, suficiente doze mici de imunogen 0,2—1 mg/doză inclusiv animalele mari	

de animale, iar calea intranodală poate duce la necroza nodulului. Animalele injectate intradermic în locuri multiple fac microabcese cutanate la locul injecţiei, dar care sînt bine suportate. Doza este aleasă în funcţie de forma, de calea de administrare şi de puritatea substanţei injectate. Dacă antigenul este destul de pur, doze de 100—200 μg sînt suficiente. Ritmul inoculărilor este variabil de la un laborator la altul şi este tatonat în funcţie de calea de administrare dar şi de răspunsul animalelor urmărit prin sîngerările-test. Specia cel mai frecvent folosită pentru obţinerea antiserurilor pentru dozări radioimunologice este iepurele. Cobaiul este folosit pentru prepararea serului anti-insulină. Cînd pentru scopuri comerciale este necesar un stoc mare de antiser, se foloseşte capra.

2.3.4. REACŢIA ANTIGEN-ANTICORP *IN VITRO*

Antiserurile obţinute prin imunizarea animalelor cu un imunogen reacţionează specific cu acesta *in vitro*. Se înţelege prin specificitatea unui antiser capacitatea anticorpilor conţinuţi în acel antiser de a distinge între antigenul corespunzător şi alte substanţe antigenice înrudite sau neînrudite cu el. Animalele imunizate produc anticorpi care dau tipuri de reacţii diferite, în funcţie mai ales de antigen. Amintim reacţii de floculare cu unele toxine microbiene, de aglutinare cu antigene corpusculare (exemplu spermatozoid), de precipitare cu antigene sau haptene solubile sau de

Scanned with OKEN Scanner

neutralizare cu antigene cu activitate biologică specifică, de exemplu hormoni. În reacţia de fixare a complementului, combinarea anticorpului cu antigenul are loc cu consum de complement.

Anticorpii precipitanţi sau neutralizanţi sînt folosiţi în dozarea radioimunologică a hormonilor. În reacţia de precipitare clasică, în mediu lichid, un amestec de antigen şi antiser în proporţii adecvate formează precipitate a căror analiză caatitativă aduce informaţii despre cantitatea de anticorp din antiser şi valenţa antigenului (fig. 2.15).

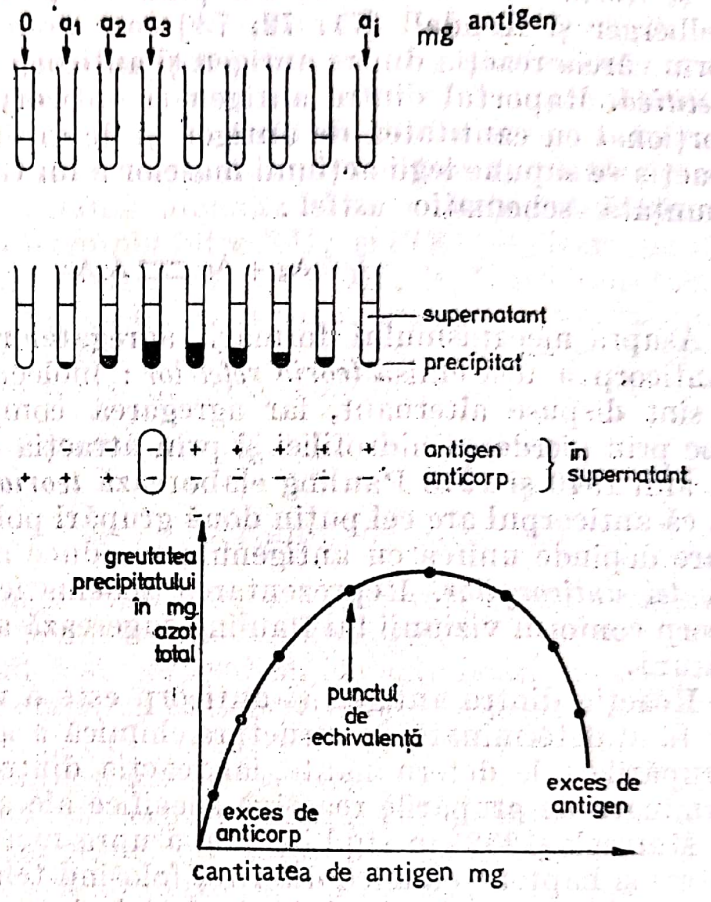


Fig. 2.15. — Schema unei reacţii de precipitare cantitativă (Heidelberger şi Kendall). Precipitatul de la punctul de echivalenţă (cantitate maximă de precipitat şi absenţa ambilor reactivi în supernatant) este folosit pentru calculul cantităţii de anticorp din precipitat, care la rîndul său reflectă conţinutul în anticorp al unui volum anumit de antiser. Analiza cantitativă a precipitatului din zona excesului de antigen, zonă în care locurile de combinare ale anticorpului sînt saturate, permite calculul valenţei antigenului ca raportul molar al anticorpului faţă de antigen, de exemplu : valenţa Ag = $\frac{x \text{ moli Ac}}{y \text{ moli Ag}}$ [70].

Analiza cantitativă a compoziţiei precipitatului arată că în primele eprubete supernatantul conţine anticorpi liberi, iar în ultimele conţine antigen liber. Zona de mijloc, în care în supernatant nu poate fi pus în evidenţă nici surplus de anticorp nici de antigen, a fost numită zona de echivalenţă. Cantitatea de precipitat este influenţată în primul rînd de cantitatea de anticorpi din antiser şi apoi de cea de antigen adăugată în amestec. Calculul raportului dintre cantitatea de antigen şi cea de anticorp arată că acest raport este subunitar, are valoare maximă în zona excesului de anticorpi şi scade progresiv în zona de echivalenţă şi în cea a excesului de antigen. Aceasta arată că anticorpul reprezintă masa principală a precipitatului, deci în compoziţia precipitatului numărul moleculelor de anticorp este totdeauna mai mare decît numărul moleculelor de antigen şi raportul molar al anticorpului faţă de antigen reprezintă valenţa antigenului.

Rezultatele cantitative obţinute variază mult în funcţie de antigen, de talia lui moleculară dar şi de specia la care este preparat antiserul. De exemplu, reacţia de precipitare cantitativă a tiroglobulinei umane cu ser

Scanned with OKEN Scanner

anti-tiroglobulină umană arată prezența a 40 de locuri de combinare pe suprafața moleculei de antigen. Scindarea enzimatică a antigenelor în fragmente mari arată că pe suprafața unei anumite proteine există locuri de combinare distincte (ca poziție în moleculă), dar identice (ca secvență de aminoacizi), numite determinante antigenice.

Istoria imunologiei înregistrează încă de la sfîrșitul secolului trecut preocupări cu privire la mecanismul intim al reacției antigenului cu anticorpul. Au fost emise, în ordine cronologică, *teoria chimică* prin analogie cu reacția acizilor tari cu bazele tari sau similar reacției dintre acizi și baze slabe și *teoria fizică-coloidală*. Începînd cu anul 1929 apar lucrările lui Heidelberger și Kendall [71, 72, 73] care aduc pe prim plan concepția conform căreia reacția dintre antigen și anticorp este o *reacție bimoleculară competitivă*. Raportul dintre antigen și anticorp într-un precipitat este proporțional cu cantitatea de antigen și de anticorp introdusă în reacție, iar reacția se supune legii acțiunii maselor a lui Guldberg și Waage și poate fi enunțată schematic astfel :

$$Ag + Ac \rightleftharpoons AgAc$$

Asupra mecanismului formării agregatelor într-un precipitat antigen-anticorp a fost emisă *teoria rețelelor* : moleculele de antigen și de anticorp sînt dispuse alternant, iar agregarea complexelor antigen-anticorp are loc prin pierderea hidrofiliei și prin atracția dintre grupările specifice. Între anii 1940 și 1943 Pauling elaborează *teoria armăturii* pornind de la ideea că anticorpul are cel puțin două grupări polare cu dispoziție specifică de care depinde unirea cu antigenul ; se aduce astfel în discuție *conceptul bivalenței anticorpilor*. Reprezentarea schematică a agregatelor antigen-anticorp conform viziunii lui Pauling sugerează aspectul de carcasă sau de armătură.

Reacția dintre antigen și anticorp este o reacție specifică, specificitatea fiind determinată de structura chimică a antigenului și condiționată de grupările sale determinante, iar reacția dintre antigen și anticorp este determinată de grupările reactive specifice ale ambelor componente [74].

Marrack (1932) în studiile sale asupra mecanismului reacției dintre anticorp și haptene chimice diferite, folosind tehnica de dializă, ajunge la următoarele concluzii cu privire la forțele intermoleculare :

— și în grupările determinante ale antigenului și în locurile de legare (receptoare) ale anticorpului, o anumită dispoziție a atomilor în moleculă realizează cîmpuri de forță care se condiționează reciproc ;

— dispoziția spațială a zonelor active ale antigenului și anticorpului permite intrarea lor în contact reciproc, realizîndu-se o *complementaritate* ;

— absența unor grupări inactive mari din molecula antigenului este favorabilă accesibilității grupărilor sale active către anticorp ;

— specificitatea este condiționată de *dispoziția sterică* a grupărilor aminice și carboxilice din grupările determinante ale antigenului.

Pentru a pune bazele moleculare ale specificității era necesar să se precizeze cîteva aspecte esențiale :

— care sînt grupările antigenului sau haptenei ce intră în reacție cu anticorpul ;

— dacă sînt deosebiri structurale între globulinele naturale și globulinele anticorp și care sînt acestea ;

— care sînt forțele care intră în acțiune în procesul de unire al antigenului cu anticorpul spre a forma, de exemplu, un precipitat ;

Scanned with OKEN Scanner

— care sînt locurile de legare ale anticorpului ;
— dacă faţă de diferitele părţi ale unei singure grupări active se formează anticorpi diferiţi.

Deşi răspunsurile sînt în majoritate fragmentare, totuşi au fost cîştigate unele certitudini. Cu ajutorul studiilor lui Landsteiner asupra sistemelor haptenă-antihaptenă s-a stabilit că în mecanismul recunoaşterii unei haptene de către anticorpul corespunzător, configuraţia generală, adică structura generală tridimensională a haptenei este mai importantă uneori decît compoziţia sa chimică.

Lucrările lui Edelman şi Porter din ultimii 15 ani au stabilit structura globulinelor anticorp, care este diferită de cea a globulinelor naturale.

Este cert că în legarea antigenului cu anticorpul nu sînt implicate legături covalente. Forţele care domină legătura dintre antigen şi anticorp sînt aceleaşi ca şi în interacţiunile nespecifice proteină-proteină (de exemplu, serumalbumină umană-transferină umană). Aceste forţe intermoleculare sînt forţele coulombiene, de exemplu între NH_3^+ şi COO^-, legături (punţi) de hidrogen — de exemplu, între OH, NH_2, COOH, legături hidrofobe, de exemplu între aminoacizi hidrofobi, ca valina, leucina şi fenilalanina şi forţe Van der Waals. Intensitatea acestor forţe creşte cu scăderea distanţei dintre moleculele de antigen şi cele de anticorp, de exemplu forţele coulombiene cresc cu inversul pătratului distanţei $\left(F = \frac{1}{d^2}\right)$, iar cele Van der Waals cu $\frac{1}{d^7}$. Natura forţelor este importantă, deoarece este esenţială pentru alegerea volumului şi mediului reacţiei antigen-anticorp şi a concentraţiei reactivilor în sistemul de dozare radioimunologică.

Toate aceste forţe sînt însă nespecifice, ele acţionează numai pentru punerea în contact a antigenului cu anticorpul şi poate pentru menţinerea potrivirii stereochimic specifice, ca „broasca cu cheia", a zonelor active a celor doi reactivi după realizarea acestei potriviri.

Aşadar reacţia antigen-anticorp ar putea fi considerată ca decurgînd cel puţin în două faze : o fază nespecifică a apropierilor intermoleculare şi o fază a combinării specifice a antigenului cu anticorpul. Specificitatea legăturii dintre antigen şi anticorp este apreciată în două moduri : prin gradul de reacţie încrucişată a anticorpului faţă de un anumit antigen cu structuri moleculare înrudite cu acel antigen şi prin aviditatea * şi/sau afinitatea ** anticorpului pentru antigen. Estimarea reacţiei încrucişate se face calitativ — există sau nu — şi cantitativ fie ca indice de specificitate [24], care ia diluţia anticorpului ca mijloc de măsurare, fie ca procent al inhibiţiei legării anticorpului cu trasorul radioactiv la o anumită cantitate de antigen înrudit cu cel specific. Pentru cantificarea afinităţii sînt necesare studii de dializă la echilibru sau alte tehnici care permit determinări corecte (tehnici radioimunologice) ale reactivilor din sistem. Afinitatea este exprimată în termeni de constantă de echilibru, pornind de la ideea că reacţia :

$$Ag + Ac \rightleftharpoons AgAc$$

---

* Roitt [70] foloseşte termenul de aviditate pentru a defini legarea dintre anticorp şi molecula de antigen luată în întregul său, adică cu toate grupările determinante (haptenice) pe care le conţine, iar prin

** afinitate înţelege interacţiunea la echilibru a anticorpului cu un singur determinant sau cu o haptenă monovalentă.

Scanned with OKEN Scanner

ascultă de legea acţiunii maselor şi atunci :

$$K = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]},$$

unde [Ag] este concentraţia haptenei, iar [Ac] reprezintă concentraţia locurilor de combinare ale anticorpului.

La o anumită concentraţie a antigenului liber (haptena) în afara sacului de dializă, jumătate din locurile de legare ale anticorpului vor fi ocupate, deci :

$$[AgAc] = [Ac]$$

şi atunci

$$K = \frac{1}{[Ag]}.$$

Aşadar, K, constanta de echilibru este egală cu reciproca concentraţiei haptenei libere la echilibru în condiţiile în care jumătate din locurile de legare ale anticorpului sînt ocupate. Pot fi obţinuţi anticorpi cu constante de echilibru de ordinul a 10^{11} l/mol.

Studiul sistemelor de dializă la echilibru, de exemplu studiul curbelor de legare în funcţie de concentraţia haptenei, arată că un antiser este alcătuit din o mixtură de anticorpi cu constante de afinitate diferite, a căror valoare variază în limite foarte largi. Aceasta sugerează că nu toate moleculele de haptenă găsesc anticorpi cu care să stabilească o legătură cu adecvare optimală. Schimbarea, după atingerea echilibrului, a apei de dializă din afara sacului duce la pierderea moleculelor de haptenă din afara sacului şi apariţia altora din interiorul sacului, observaţie care atestă reversibilitatea reacţiei antigen-anticorp.

Determinarea constantei de echilibru K a permis aplicarea legilor termodinamicii la studiul reacţiei antigen-anticorp şi au fost măsurate entalpia * ΔH şi entropia ** ΔS a acestui tip de reacţie. Ar fi de aşteptat ca formarea complexelor antigen-anticorp să ducă la creşterea ordinii, deci la scăderea entropiei, dar practica a arătat că entropia încă mai creşte, deci creşte dezordinea sistemului de reacţie. Fenomene de remodelare a macrostructurilor anticorpului, ca schimbarea formei T în formă Y sau pierderea apei în cursul reacţiei de cuplare dintre antigen şi anticorp pot explica în parte creşterea entropiei. Aşadar, *natura* reacţiei antigen-anticorp este cunoscută numai parţial. Forţa de legătură dintre antigen şi anticorp este cuprinsă între 4 şi 14 kcal/mol, ceea ce exclude forţe de legătură ionice (electrovalenţă) sau atomice (covalenţă), care au energii de ordinul a 20—200 kcal/mol. Se presupune că energiile de legătură dintre antigen şi anticorp rezultă din însumarea altor trei tipuri de legături intermoleculare : legăturile de hidrogen, legăturile var der Waals şi interacţiunile dipolilor.

Complexe antigen-anticorp solubile. În dozările radioimunologice, spre deosebire de dozările imunochimice bazate pe reacţii de precipitare, complexele antigen-anticorp sînt complexe solubile, cu excepţia sistemelor

---

* = căldura de reacţie ; se exprimă în cal/mol sau kcal/mol.
** = măsură a dezordinii unui sistem ; se exprimă în cal/grad × mol.

Scanned with OKEN Scanner

cu antigen cu talie foarte mare (megapeptide) care pot da complexe parțial insolubile. Condiția insolubilității complexelor rezultă din însuși principiul RIA, care prevede prezența în sistemul de dozare a unei cantități limitate de anticorp pentru care competiționează antigenul marcat și nemarcat. Așadar, într-un sistem de analiză radioimunologică complexul antigen-anticorp se formează în condiții de *exces de antigen*. Concentrația reactivilor care formează complexele este redusă, antigenul marcat se află în sistem în concentrații de ordinul nanogramelor, iar anticorpul în concentrații aproape de ordinul microgramelor, inhibiția competitivă a legării acestor doi reactivi realizîndu-se cu concentrații care ating cîteva zeci de nanograme. Solubilitatea complexelor antigen-anticorp din sistemul RIA face imposibilă separarea acestora, prin centrifugare simplă; de aceea sînt necesare metode speciale pentru izolarea lor de antigenul rămas liber în sistem. Proba de solubilitate a complexelor antigen-anticorp se face prin absența precipitatelor la centrifugarea clasică sau prin observarea aspectelor de sedimentare similare proteinelor solubile la ultracentrifugare [24]. Solubilitatea complexelor antigen-anticorp în sistemele RIA poate fi rezultatul excesului de antigen, al concentrației reduse a reactivilor, dar și al taliei moleculare reduse a antigenului.

În RIA se lucrează curent cu greutăți moleculare de la cîteva sute pînă la aproximativ 50 000; se pare că în sisteme care conțin antigene cu *GM* de 25 000—50 000 (de exemplu HGH, HPL, HCG) complexele nu sînt total solubile [24]. Ar fi important de cercetat în acest sens dacă sistemul RIA tiroglobulină-antitiroglobulină duce la formarea complexelor solubile, știind că tiroglobulina are *GM* de aproximativ 600 000. Provizoriu, s-a apreciat că limita superioară a greutății moleculare a antigenului pentru formarea complexelor solubile în sistem RIA este de aproximativ 30 000 [24].

2.3.5. CARACTERIZAREA ȘI UTILIZAREA ANTISERULUI

Dozarea radioimunologică a unei substanțe depinde în primul rînd de calitatea antiserului. Producerea unui antiser implică cele mai multe incertitudini în punerea la punct a unei dozări noi; de aceea, este utilă precizarea metodelor de caracterizare. Sînt recomandate trei căi principale pentru caracterizarea unui antiser adecvat RIA.

Determinarea titrului se face cu ajutorul reacției dintre antigenul marcat și diluții seriate ale antiserului. Se definește prin titrul radioimunologic al unui antiser, acea diluție a antiserului care leagă 30—60% din cantitatea de antigen marcat adăugată sistemului (fig. 2.16). Titrul este influențat de timpul și temperatura de incubare și de concentrația antigenului marcat prezent în sistem. De aceea, în altă accepțiune a titrului radioimunologic, se definește titrul ca acea diluție de antiser care leagă 50% din antigenul marcat care se află în concentrația de 1 ng/ml de amestec de incubare [75]. Această definiție a titrului se deosebește de definiția imunochimică clasică. Titruri mari nu înseamnă neapărat și afinitate mare. Din analiza curbei de diluție a diferitelor antiseruri se poate stabili nu numai titrul, dar și afinitatea anticorpilor, care este dată de panta inflexiunii curbei, și anume cu cît panta este mai abruptă cu atît afinitatea este mai mare [75].

Scanned with OKEN Scanner

Titrul fixează parametrul cantitativ al antiserului şi astfel se poate estima cantitatea de anticorp (diluţia antiserului) care poate fi folosită în reacţie dar nu permite aprecieri calitative cu privire la afinitatea anticorpilor conţinuţi într-un antiser. Pentru aprecierea calitativă a unui antiser este necesar să fie determinată constanta de echilibru (sau de afinitate) K, de a cărei valoare depinde sensibilitatea dozării. Estimarea

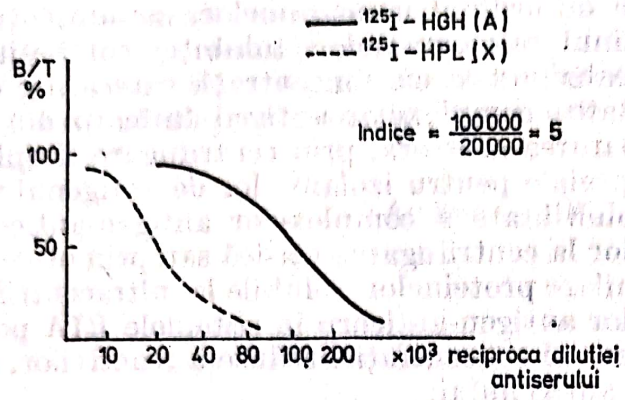


Fig. 2.16. — Curba experimentală a diluţiilor seriate de ser anti-HGH cu ^{125}I-HGH şi cu ^{125}I-HPL şi calculul indicelui de specificitate [24].

constantei de afinitate K se face cu ajutorul unei curbe standard rezultată din reducerea legării antigenului marcat la o cantitate fixă de anticorp în prezenţa unor concentraţii crescînde de antigen nemarcat.

Examinînd curba standard se observă că cu cît panta curbei este mai abruptă cu atît constanta de afinitate este mai mare şi, implicit, sensibilitatea este mai bună. Aşadar, prognosticul afinităţii antiserului în sistemul de dozare se poate face fie inspectînd o curbă standard, fie prin calcul. Pentru calculul constantei K se pune condiţia ca, înainte de a intra în reacţie, concentraţia molară a anticorpului să fie egală cu concentraţia molară a antigenului.

Reacţia poate fi reprezentată prin următoarea ecuaţie :

$$[Ag] + [Ac] \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [AgAc] \qquad (2.1)$$

unde parantezele reprezintă concentraţiile molare ale reactivilor, iar k_1 şi k_2 reprezintă constantele de asociere şi de disociere. Conform legii acţiunii maselor, la echilibru,

$$K = \frac{k_1}{k_2}$$

şi atunci

$$K[Ag][Ac] = [AgAc] \qquad (2.2)$$

La echilibru,

$$\frac{B}{F} = \frac{[AgAc]}{[Ag]} \qquad (2.3)$$

Din ecuaţia (2.2) reiese că

$$K = \frac{B}{F} \cdot \frac{1}{[Ac]}$$

Dar condiţia iniţială a fost că

$$[Ac] = [Ag],$$

deci

$$K = \frac{B}{F} \cdot \frac{1}{[Ag]}.$$

Raportul $\frac{B}{F}$ în absența antigenului nemarcat este obișnuit egal cu 1, de aceea:

$$K = \frac{1}{[Ag]}$$

Valorile obținute pentru constantele de afinitate ale antiserurilor folosite în radioimunoanalize sînt de ordinul a $10^9 - 10^{12}$l/mol. Aceasta reprezintă în realitate afinitatea anticorpilor predominanți, știut fiind că antiserurile sînt amestecuri eterogene de anticorpi cu constante de afinitate diferite. Condiția ideală a unui antiser este titrul ridicat și să conțină anticorpi cu constante de afinitate mari. Această condiție nu este ușor de realizat și de aceea sînt folosite metode de izolare a anticorpilor cu afinitate mare, metode care au inconvenientul că necesită mari cantități de antigen.

Un alt parametru indispensabil pentru punerea la punct a unei dozări radioimunologice este *specificitatea* anticorpilor. În sens strict, prin specificitatea unui antiser se înțelege capacitatea de a distinge antigenul corespunzător de o mixtură de antigene similare prezente în sistem în concentrații oricît de mari. Aceste condiții ideale nu sînt frecvent realizate, de aceea, în mod practic, au fost propuse metode experimentale și formule cu ajutorul cărora se pot aprecia gradul de specificitate al unui antiser și condițiile de folosire în sistemele de dozare.

Lipsa specificității anticorpilor, exprimată prin prezența reacțiilor încrucișate cu antigene structural similare cu antigenul partener este o consecință a capacității unui situs de combinare al anticorpului de a lega două substanțe cu semnificații fiziologice diferite.

Reacțiile încrucișate întîlnite în practica dozărilor radioimunologice ale hormonilor pot fi clasificate în reacții încrucișate ale hormonilor polipeptidici și ale hormonilor steroizi.

Sînt recunoscute trei surse principale ale reactivității încrucișate: antigene peptidice, în special de extracție, mai rar de sinteză, impure, contaminate cu alți hormoni și care prin inoculare duc la formarea unor populații de anticorpi cu specificități multiple; hormoni peptidici cu secvențe de aminoacizi comune cu alți hormoni; hormoni steroizi cu structuri chimice asemănătoare.

Prezența într-un antiser a mai multor specii de anticorpi pentru antigene diferite A, B, C poate perturba un sistem radioimunologic numai dacă într-un sistem alcătuit din anticorp anti-A și antigen A, anticorpul anti -A leagă și antigenele B și/sau C cînd acestea sînt prezente în sistemul de reacție în concentrații suficiente. Reacțiile încrucișate ale hormonilor polipeptidici au fost grupate în categorii [24]:

— reacții încrucișate între hormonii permanenți hipofizari (ACTH și MSH sau LH, FSH, TSH) și nehipofizari (ca glucagonul pancreatic și cel intestinal);

— reacții încrucișate între hormoni permanenți și hormoni temporari, adică între hormonii glandulari și cei plancetari, de exemplu între

LH şi HCG, între HGH şi HPL(HCS) sau între TSH hipofizar şi cel placentar. Acest tip de reacţie este considerată ca o reacţie încrucişată adevărată în sensul că nu poate fi evitată în condiţii în care concentraţia hormonului perturbant este suficientă pentru a interveni în sistemul de dozare;

— reacţii încrucişate între hormoni permanenţi şi hormoni patologici, cum sînt hormonii ectopici secretaţi de tumori (tirocalcitonina, ACTH, insulina, HGH, TSH);

— reacţii încrucişate între hormoni şi precursori sau produşi rezultaţi din catabolizarea lor, ca de exemplu proinsulina, „big" ACTH sau fragmente de ACTH.

Este de remarcat că, ocazional, seruri anti-HGH au putut fi folosite pentru dozarea radioimunologică a prolactinei umane, consecinţă a similitudinii structurale a acestor doi hormoni, asociată cu caracterul întîmplător al răspunsului imunitar al animalelor inoculate.

Problemele legate de specificitatea antiserurilor sînt diferite pentru sistemele RIA omologe (HGH), heterologe (Pth), mixte (insulina) sau nediferenţiate (steroizi).

Pentru evitarea confuziilor pe care le poate introduce într-un sistem de dozare lipsa de specificitate a unui antiser, au fost propuse metode pentru aprecierea calitativă şi cantitativă a reacţiilor încrucişate posibile.

A fost propus un indice de specificitate care se adresează antiserului [24] şi constă din testarea legării de către un antiser faţă de compusul A, a compusului A marcat şi a unui compus X bănuit ca perturbator, folosind curba de diluţie a antiserului (fig. 2.16). Raportul diluţiilor antiserului pentru legarea 50% a fiecărui compus, reprezintă indicele de specificitate, care tinde către 1 cînd antiserul nu distinge compusul A de compusul X, către infinit cînd antiserul este foarte specific, şi între 5 şi 20, cînd antiserul este uşor nespecific. Din figura 2.16 reiese că la diluţia de lucru a antiserului folosită în sistemul de dozare al HGH este puţin probabil să poată fi legat şi HPL dacă acesta s-ar afla în sistem, ca în dozarea HGH la gravide. Calculul acestui indice este însă laborios, necesitînd ca toţi presupuşii contaminanţi să fie marcaţi şi de aceea este limitativ.

O altă cale de a aprecia gradul de reactivitate încrucişată într-un sistem ser anti-compus A şi compusul A marcat este determinarea cantităţii de compus A nemarcat care inhibă cu 50% legarea reactivilor parteneri precum şi a cantităţii de compus X care determină tot o inhibiţie de 50% a legării.

Procentul reactivităţii încrucişate este dat de raportul: $\frac{A\ 50\%}{X\ 50\%} \times 100.$

Un procent de 100% arată nespecificitatea antiserului şi cu cît procentul este mai mic, cu atît probabilitatea unei perturbări prin reacţie încrucişată este şi ea mai mică. Acest procedeu permite ca în acelaşi sistem antiser-antigen marcat să poată fi studiată reactivitatea încrucişată cu o varietate de substanţe. Rezultatele acestui calcul sînt aplicate diferenţiat la fiecare sistem, ţinînd seama de probabilitatea prezenţei unei substanţe perturbatoare în sistemul de dozare radioimunologică. De exemplu, o reacţie încrucişată de 20% a HPL poate să nu descalifice un antiser pentru HGH dacă acesta este folosit pentru dozări în lichide biologice în care nu există şanse ca substanţa perturbatoare să fie prezentă, cum este cazul dozărilor HGH în serul sanguin în afara sarcinii.

Scanned with OKEN Scanner

Este locul aici să fie amintit şi un aspect legat de procedeele de stabilire a identităţii unui compus X (necunoscut) cu substanţa A, care a servit pentru producerea antiserului. Dacă avem substanţă X în cantitate suficientă, se poate calcula raportul $\frac{A\ 50\%}{X\ 50\%} \times 100$ sau se poate trasa o curbă cu concentraţii progresive din substanţa X, curbă care este comparată cu curba dată de substanţa A nemarcată. Suprapunerea sau paralelismul acestor curbe a fost considerat ca un indicator al identităţii, deşi nu toţi autorii sînt de aceeaşi părere [52]. Dificultăţi greu de rezolvat apar în cazul unor lichide biologice cu concentraţii reduse ale substanţei X. Acesta este cazul prezenţei unor hormoni hipofizari în LCR (lichid cefalorahidian) la persoane normale (fără perturbări mecanice ale circulaţiei LCR) [76].

Standardizarea antiserurilor. Antiserurile sînt lichide complexe, care conţin un spectru de anticorpi cu energii de legare (afinităţi) care variază în limite largi. Caracteristicile antiserului (titrul, afinitatea şi specificitatea) apar diferite calitativ şi cantitativ dacă condiţiile de testare sînt modificate ţinînd seama că pot interveni o serie de factori diverşi ca metoda de testare, calitatea trasorului, tehnica de separare etc. De aceea s-a conchis că antiserului i se poate aplica „legea tot sau nimic", ceea ce înseamnă că un antiser este bun sau nu pentru scopul pentru care a fost preparat [77]. În aceste condiţii, folosirea antiserurilor de referinţă—antiseruri etalon—nu pare utilă. Totuşi uniformizarea reactivilor, în special pentru laboratoarele de rutină, rămîne încă un deziderat, ţinînd seama că nu toţi cei care aplică tehnicile RIA au şi posibilitatea să-şi prepare antiserurile. În acest scop apare utilă vehicularea unor antiseruri naţionale sau regionale după exemplul Consiliului britanic de cerçetări medicale (British Medical Research Council) sau al Agenţiei naţionale pentru hipofiză din Statele Unite (U.S. National Pituitary Agency).

Purificarea antiserurilor şi izolarea anticorpilor specifici. Antiserurile specifice pot fi folosite, în sistemele de radioimunoanaliză, ca atare sau fracţiunea gamaglobulinică izolată prin precipitare cu alcool, sulfat de sodiu sau de amoniu, rivanol sau prin cromatografie preparativă pe gel de dextran (Sephadex, Biogel).

Antiserurile nespecifice (cu specificităţi multiple) sînt supuse absorbţiei cu antigenul (în formă solubilă) cu care dă reacţie încrucişată ca în cazul serurilor anti-FSH care sînt absorbite cu HCG pentru a îndepărta anticorpii anti-LH. În altă variantă, antigenul cu care antiserul dă reacţii încrucişate este adăugat direct în sistemul de dozare, ca în cazul RIA TSH cînd se adaugă HCG pentru a elimina interferenţa LH în dozare.

Atît tehnicile de precipitare cu substanţe chimice cît şi operaţiile de absorbţie (neutralizare) prezintă inconvenientul că duc la scăderea titrului anticorpilor.

În sistemele radioimunologice este necesar uneori, ca în cazul variantei imunoradiometrice, să se utilizeze anticorpi foarte purificaţi. În acest scop s-a recurs la absorbţia antiserurilor pe antigene insolubilizate. Tehnica prevede trei faze principale : insolubilizarea antigenului ; absorbţia anticorpilor specifici pe antigenul insolubilizat ; eluarea anticorpilor de pe antigenul insolubilizat (imunosorbent) [78].

Insolubilizarea antigenelor poate fi realizată fie prin polimerizarea antigenelor pentru a le face insolubile, fie prin cuplarea antigenelor pe

Scanned with OKEN Scanner

suporţii insolubili ca derivaţi ai celulozei sau alţi polimeri. Antigenul purificat este legat covalent de particulele inerte şi este folosit apoi pentru a izola anticorpii specifici din antiser. Anticorpul legat este disociat prin eluţie în mediu acid. Metoda este folosită pentru obţinerea anticorpilor anti-FSH din antiseruri care dau reacţii încrucişate şi cu LH şi cu TSH. Din aceste antiseruri pot fi izolaţi, prin tratare similară, şi anticorpii anti-LH sau anti-TSH [79].

Geluri de particule inerte încărcate cu antigen sînt folosite pentru cromatografia de afinitate pe coloană; prin această tehnică pot fi obţinute din antiseruri fracţiuni cu afinităţi diferite; în acest fel au fost obţinute două fracţiuni de anticorpi din serul antitestosteronă cromatografiat pe gel de Sepharoză-Testosteronă [80].

Imunosorbenţii pot fi folosiţi şi ca mijloc de separare în dozarea radioimunologică [81].

Forma de utilizare a antiserurilor. În dozările radioimunologice antiserul este folosit sub două forme principale: în forma solubilă şi insolubilizat. Antiserul în forma solubilă este utilizat ca atare sau tratat în prealabil cu cărbune pentru eliminarea haptenelor omologe din serul animalului; nu se recomandă folosirea amestecului de antiseruri [77]. Sînt folosite de asemenea fracţiunile gamaglobulinice obţinute fie prin precipitare, fie prin cromatografie de afinitate. Dacă antigenul folosit pentru prepararea imunosorbentului este pur, cromatografia de afinitate permite izolarea anticorpilor cu afinitate maximă.

În forma *insolubilă*, antiserul este utilizat într-o varietate de forme dintre care cele mai uzitate sînt *preprecipitarea* cu al doilea anticorp ca în truse pentru RIA insulinei, *absorbit pe discuri* sau eprubete din polimeri macromoleculari (polistiren, polipropilen etc.), *legat covalent* pe particule de Sepharoză sau pe discuri de hîrtie de filtru ca în trusa de HPL.

Forma insolubilă a anticorpului are dublu sens: anticorpii sub această formă sînt mai puri (de exemplu la încărcarea unor eprubete din material plastic cu antiser total, polimerul reţine anticorpii cu afinitatea cea mai ridicată), iar pe de altă parte complexele antigen-anticorp insolubil pot fi uşor separate din sistem, separare numită în fază solidă, care va fi tratată în paragrafele următoare.

Conservarea antiserurilor. Tehnicile de conservare necesită adaptări după forma solubilă sau insolubilă a antiserului. Antiserul în formă solubilă poate fi conservat la temperaturi joase, de exemplu prin *congelare* [82, 83], care este modalitatea cea mai uzuală. Se cunosc prea puţine detalii cu privire la fenomenele care apar în cursul congelării unui lichid atît de complex. S-a dedus, prin analogie cu soluţii simple de electroliţi, că serul sanguin ar trebui să se comporte ca o soluţie eutectică * de clorură de sodiu, care are punctul de congelare în jurul a −22°C. În realitate, serul sanguin nu este complet congelat decît între −50°C şi −60°C [82]. Practic, antiserurile sînt păstrate ca atare sau preferabil diluate în tampon, cu sau fără conservant, în porţii mici în eprubete din material plastic (rezistent la temperaturi joase), bine închise.

---

* Se înţelege prin soluţie eutectică, o soluţie astfel diluată încît, la coborîrea temperaturii sub zero grade, apa formînd cristale, exclude moleculele de clorură de sodiu pînă cînd acestea ating concentraţia critică la care amestecul devine solid; această concentraţie este numită concentraţie eutectică, iar temperatura la care soluţia îngheaţă este caracteristică diferitelor substanţe sau amestecuri.

Scanned with OKEN Scanner

Nu se folosesc bacteriostatice de tipul crezolilor. Congelarea şi decongelarea se fac rapid. Se recomandă evitarea congelărilor şi decongelărilor repetate. Păstrarea la +4°C necesită adăugarea substanţelor bacteriostatice. Conservarea prin *liofilizare* implică aceleaşi reguli ca liofilizarea oricăror soluţii proteice concentrate.

Anticorpul în forma insolubilizată poate fi liofilizat şi păstrat la +4°C, ca de exemplu anticorpul precipitat; anticorpul sub alte forme de insolubilizare (absorbit pe polimeri de tip polistiren) poate fi păstrat la +4°C.

2.4. HORMONUL MARCAT

2.4.1. HORMONII PROTEICI ŞI POLIPEPTIDICI MARCAŢI CU RADIOIOD

Substanţele marcate cu un radionuclid permit extinderea sensibilităţii metodelor de dozare *in vitro* cu cîteva ordine de mărime comparativ cu metodele imunochimice de exemplu. Teoretic, pare mai firesc să marcăm o substanţă prin substituirea unui atom prezent în structura sa, de exemplu tritiu, carbon sau sulf, menţinînd astfel intactă structura chimică a moleculei marcate. Totuşi, marcarea proteinelor şi a polipeptidelor cu atomi străini structurii lor chimice, ca brom, crom sau iod, şi-a demonstrat utilitatea, Polipeptidele corect marcate cu radioiod nu pot fi deosebite, prin tehnicile uzuale, de substanţa nativă [84—89].

2.4.2. HORMONI STEROIZI MARCAŢI CU RADIOIOD

Cu unele excepţii (^{125}I-testosterona, ^{75}Se-Cortisol, ^{125}I-Cortisol) în dozarea hormonilor steroizi sînt folosiţi steroizi marcaţi cu tritiu. Asupra procedeului de marcare cu tritiu nu insistăm întrucît este descris în partea I.

Deşi steroizii pot fi marcaţi şi prin substituţia unui hidrogen cu iod, totuşi aceşti compuşi nu sînt utili pentru dozarea radioimunologică sau competitivă. Pentru acest scop sînt folosite conjugate steroid-tirozină, substituţia avînd loc la nivelul aminoacidului, folosind metodele de marcare uzuale, cel mai frecvent cu cloramina-T. Separarea iodurii libere şi testarea purităţii se fac prin cromatografie în strat subţire, iar utilitatea pentru dozare se probează după acelaşi model ca şi pentru hormonii polipeptidici.

Conjugatul clasic folosit pentru marcarea cu radioiod este steroid-carboximetil oximă-tirozin-metil-ester (TME). Poziţia conjugării tirozinei pe molecula de steroid urmează aceleaşi reguli ca şi conjugarea steroizilor cu proteine pentru prepararea imunogenului. Aceste reguli ţin seama de observaţia că anticorpul „vede", adică recunoaşte porţiuni ale moleculei steroide situate la distanţă de locul conjugării.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Tiselius, *Biochem. J.*, **31**, 1464 (1937).
2. A. Tiselius, E.A. Kabat, *Science*, **87**, 116 (1938).
3. R.R. Porter, în *„Basic problems in neoplastic disease"*, Columbia Univ. Press, N.Y., 1962, p. 177.

Scanned with OKEN Scanner

4. G.M. Edelman, în „Developmental aspects of antibody formation and structure", editat de Sterzl J. și I. Riha, Academia Praga, 1970, p. 381.
5. G.M. Edelman, în „Cellular selection and regulation in the immune response", editat de G.M. Edelman, Raven Press Publ., New York, 1974, p. 1.
6. V. Gheție, în „Progrese recente în disciplinele imunologice", editat de N. Nestorescu, Edit. medicală, București, 1969, p. 67.
7. F.W. Putnam, *Science*, **163**, 633 (1969).
8. I.M. Roitt, „Essential immunology", ed. a II-a, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1977.
9. D.S. Rowe, în „Clinical aspects of immunology", editat de P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs, P.J. Lachmann, ed. a III-a, Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1975, p. 285.
10. R.C. Valantine, N.M. Green, *J. Mol. Biol.*, **22**, 615 (1967).
11. V. Gheție, în „Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie", editat de I. Mesrobeanu și St. Berceanu, Edit. Academiei, 1975, p. 91.
12. V. Gheție, L. Buzilă, *Rev. roum, Biochim.*, **9**, 125 (1972).
13. B.A. Cunningham, P.D. Gottlieb, M.N. Pellumm, G.M. Edelman, în "Progress in immunology", Acad. Press., New York, 1971, p. 3.
14. E.A. Kabat, „Structural concepts in immunology and immunochemistry", Holt, Rinehart and Wiston, New York, 1968, 112.
15. B. Friedenson, E. Appella, O.A. Roholt, D. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1208 (1972).
16. S. Singer, *Adv. Protein Chem.*, **22**, 1 (1967).
17. F. Karush, *Adv. Immunol.*, **2**, 1 (1962).
18. E.A. Kabat, M.M. Meyer, „Experimental Immunochemistry", Ch. C. Thomas Publ., Springfield, Ill., 1971.
19. S. Dubiski, *Nature*, **214**, 1365 (1967
20. K.R. Jorgensen, *Acta endocrinol.*, **60** 719 (1969).
21. L. Mesrobeanu, E. Păunescu, în „Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie", editat de I. Mesrobeanu și St. Berceanu, Edit. Academiei, 1975, p. 59.
22. P.G.H. Byfield, M.B. Clark, K. Turner, G.V. Foster, I. Mc Intyre, în „Calcitonin 1969", Proc. Second Int. Symp., 21—24 iulie 1969, William Heinemann Medical Books Ltd., Londra, 47.
23. J. Vaitukatis, J.B. Robbins, E. Nieschag, G.T. Ross, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 988 (1971).
24. M.L. Aubert, „Critical study of the radioimmunological assay for the dosage of the polypeptide hormones in plasma", Ed. Minerva Medica, Torino, 1971.
25. T. Chard, M.L. Forsling, M.A.R. James, M.J. Kitan, J. Landon, *J. Endocrinol.*, **46**, 533 (1970).
26. T. Chard, M.J. Kitan, J. Landon, *J. Endocrinol.*, **46**, 269 (1970).
27. K. Landsteiner, „The specificity of serological reaction", Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1945.
28. M. Sela, „The antigens", vol 1, Academic Press. Inc., New York, 1973.
29. K. Landsteiner, J. van der Scheer, *J. Exper. Med.*, **56**, 399 (1932).
30. K.Landsteiner, J. van der Scheer, *J. Exper. Med.*, **57**, 633 (1963).
31. J.J.L. Playfair, B.A.L. Hurn, D. Schulster, *Brit. Med. Bull.*, **30**, 24 (1974).
32. R.B. Goudie, C.H.W. Horne, P.C. Wilkinson, *Lancet*, **2**, 1224 (1966).
33. V.H.T. James, S.L. Jeffcoate, *Britt. Med. Bull.*, **30**, 50 (1974).
34. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957).
35. H.G. Korana, *Chem. Rev.*, **53**, 145 (1953).
36. J.C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1067 (1955).
37. P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs, în „Clinical aspects of immunology", editat de P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs și P.J. Lachmann, ed. a III-a, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1975, p. 3.
38. E. Haber, L. Page, G.A. Jacobi, *Biochemistry*, **4**, 693 (1965).
39. C.S. Walker, S.J. Clark, H.H. Wotiz, *Steroids*, **21**, 259 (1973).
40. T.L. Goodfriend, G.D. Fasman, L. Levine, D. Kemp, *Immunochem.*, **3**, 223 (1966).
41. A. Arimura, H. Sato, T. Kumasaka, R.B. Worobec, L. Debeljuk, J. Dunn, A.V. Schally, *Endocrinology*, **93**, 1092 (1973).
42. T. Chard, M.J. Martin, *Brit. Med. Bull.*, **30**, 74 (1974).
43. P.F. Gilliland, T.E. Prout, *Metabolism*, **14**, 912 (1965).
44. W.D. Odell, A.C. Charters, W.D. Davidson, J.C. Thomson, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **28**, 1840 (1968).
45. G.D. Niswender, A.R. Midgley Jr., în „Immunologic methods in steroid determination", editat de F.G. Péron și B.V. Caldwell, Appleton-Century-Crofts, Meredith Corp., New York, 1970, p. 149.
46. R.M. Bassiri, R.D. Utiger, *Endocrinol.*, **90**, 722 (1972).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

ALTE COMPONENTE ALE SISTEMULUI RIA

3.1. PREPARATUL DE REFERINȚĂ SAU STANDARDUL

În radioimunodozare, cantificarea rezultatelor se bazează pe compararea reducerii legării antigenului marcat la anticorpul corespunzător determinată de probele necunoscute cu cea determinată de un preparat standard în același lot de dozare și pe cît posibil în condiții identice. Cantificarea comparativă a substanțelor bioactive a fost fundamentată în urmă cu peste 50 de ani, odată cu standardizarea biologică a insulinei. Principiile de bază ale standardizării biologice [1, 2] au fost completate cu noi reguli aplicabile sistemelor de dozare radioimunologică [3—17]. Nu sînt dificultăți la alegerea și folosirea standardelor pentru dozarea radioimunologică a unor substanțe, care pot fi obținute în cantități suficiente într-o formă pură, ca digoxina, hormonii tiroidieni și hormonii steroizi, prostaglandinele sau nucleotidele ciclice; aceste substanțe pot fi obținute pe cale comercială. Probleme grele, care nu pot fi rezolvate decît în etape, pun dozările radioimunologice (dar și biologice) ale hormonilor polipeptidici; pentru rezolvarea lor au fost create organisme și instituții internaționale specializate, ca de exemplu Comisia de experți în standarde biologice (și radioimunochimice) de pe lîngă OMS (Organizația Mondială a Sănătății), Departamentul de standarde biologice de pe lîngă National Institute for Medical Research (Marea Britanie) sau NIAMDD—NIH din Statele Unite. Aceste instituții se ocupă cu rezolvarea problemelor fundamentale ale standardizării biologice, imunochimice și radioimunochimice și oferă gratuit preparate de referință împreună cu materialele informative corespunzătoare, ușurînd astfel munca cercetătorilor. Pentru elaborarea preparatelor de referință, instituțiile menționate colaborează cu instituții naționale sau regionale cu profil asemănător, cu laboratoare specializate și primesc informații și sugestii de la beneficiarii care utilizează standardele internaționale.

3.1.1. CANTIFICAREA CU AJUTORUL PREPARATELOR DE REFERINȚĂ

Extinderea rapidă a metodelor de radioimunoanaliză și a tehnicilor înrudite de la cercetare la aplicațiile largi în clinică a dus la folosirea unor truse de reactivi din surse variabile (comerciale sau produse în laborator). Condițiile locale de dozare fiind însă diferite de la un laborator la altul,

Scanned with OKEN Scanner

apare necesitatea adoptării unor măsuri comune, care să permită comparabilitatea rezultatelor obţinute între diferitele laboratoare. De asemenea, instabilitatea reactivilor cu care se efectuează dozările cu radioizotopi, ca de exemplu degradarea trasorului prin radioliză în cursul conservării sau scăderea titrului anticorpului în cursul unei perioade de timp mai îndelungate, necesită măsuri pentru asigurarea continuităţii rezultatelor analizelor.

Asigurarea reproductibilităţii unei tehnici de radiodozare, a continuităţii exprimării rezultatelor precum şi corectitudinea comparării rezultatelor obţinute în laboratoare diferite sînt dependente de respectarea anumitor reguli de biometrie generate de alegerea şi folosirea adecvată a unui punct de referinţă comun : standardul. Folosirea preparatelor standard oferă în plus şi avantajul (implicit) că pot fi detectate rapid imperfecţiuni ale metodologiei de dozare.

Elaborarea standardelor comune (internaţionale, naţionale sau regionale) are deci ca scop crearea posibilităţilor de comparare a rezultatelor obţinute în centre diferite şi economisirea timpului cercetătorilor şi a materialelor necesare pentru elaborarea unui standard, prin distribuţia unor mici cantităţi din preparatul comun. În plus, aceste preparate servesc pentru obţinerea în cantităţi suficiente a standardelor de laborator calibrate faţă de cele comune (internaţionale sau naţionale).

3.1.2. PROBLEME ALE RIA. NECESITATEA STANDARDELOR ŞI A STANDARDIZĂRII

Principiul de bază al oricărui sistem de cantificare comparativă este acela că „*ceva similar se compară cu ceva similar*" (like is compared with like) [3, 4, 5]. În esenţă, aceasta înseamnă că pornim de la presupunerea că substanţa pe care o dozăm este identică în cele două produse pe care le comparăm şi anume, în proba necunoscută şi în preparatul standard sau mai poate însemna că, chiar dacă există diferenţe între ele, sistemul de dozare nu le sesizează [3, 4, 5]. În RIA, aceasta înseamnă că standardul trebuie să fie imunochimic identic cu substanţa pe care o măsurăm. Identitatea rezultă din comportarea identică a situsurilor de legare ale anticorpului faţă de antigenul radioactiv (trasorul) dar şi faţă de standard şi de proba necunoscută.

Ca şi în cazul biodozărilor, şi în radioimunoanaliză măsura în care neidentitatea perturbă dozarea este dependentă de *specificitatea* şi *precizia* întregului sistem de dozare.

Structura moleculară a hormonilor poate să varieze în funcţie de mai mulţi factori, ca sursa (glandă, plasmă, urină, salivă, LCR) sau tehnica chimică de extracţie. În lichidele biologice, în afara hormonilor dominanţi, pot exista forme izomere, precursori sau metaboliţi. De aceea, specificitatea sistemelor de dozare poate fi perturbată prin prezenţa în sistem a unor mixturi, în proporţii variabile, de antigene imunochimic înrudite, situaţii întîlnite frecvent (tabela 3.1) şi care creează probleme în ceea ce priveşte cantificarea comparativă. Este interesant de remarcat că perturbările sistemelor de dozare de către formele eterogene ale hormonilor au fost exploatate în scopul obţinerii informaţiilor cu privire la metabolismul unor hormoni (tabela 3.1). Totuşi, dezavantajul perturbării sistemelor de

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 3.1

Situații în care apar diferențe între substanța de dozat și preparatul de referință determinînd rezultate disparate ale dozării (după Bangham și Cotes, 1974) [5]

Exemple de forme care pot reacționa în sistemul de dozare	Exemple de diferențe (abateri structurale) care pot apărea
I. Substanțe cu origine naturală	
Specii animale diferite	Insulina porcină, bovină — insulina umană Calcitonina de pește — calcitonina umană
Tulpini diferite	Virusuri : antigenul hepatitei B
Țesuturi normale diferite	Glucagon pancreatic — enteroglucagon TSH hipofizar — TSH placentar
[illegible]	
Același țesut normal	Glucagon pancreatic cu mărimi diferite
Țesut glandular hipertrofiat	HGH secretat în acromegalie
Tumori asociate cu producția hormonală ectopică	„Big ACTH"
Tumori ale sursei normale de producere a hormonului	HCG în mola hidatiformă
Lichide biologice (plasmă, urină, LCR) și extracte glandulare	Diferite forme ale LH, FSH, TSH
Țesut normal în cursul sarcinii (hipofiza și placenta)	HGH și HPL
Forme alelice care apar în mod normal	Insulinele de șobolan Calcitoninele de pește
Forme alelice determinate genetic	Izoenzime
Precursori	Proinsulina Angiotensinogenul
Conjugați metabolici	Steroizi în urină și plasmă
Fragmente rezultate din metabolism	Fragmente de ACTH, angiotensină II, III, HCG, produși de degradare a fibrinei
II. Artefacte posibile prin manipularea *in vitro* a standardului, a reactivilor sau a probei de dozat	
Contaminarea cu alte proteine sau cu alți hormoni și cu produși de scindare ai lor	Extractele de hipofiză sau de placentă Insulina, glucagonul
Desamidare	LH, FSH, TSH, HCG
Desializare prin pH acid sau prin neuraminidază (ex. bacteriană)	ACTH, parathormon bovin, calcitonina
Oxidarea grupării metionină cu pierderea activității	Produși de degradare ai fibrinogenului, instabilitatea hormonilor în plasmă
Degradarea prin enzime proteolitice dar și plasmina, trombina, complementul tisular al catepsinelor, enzime bacteriene și angiotensinaze	
Alterare prin liofilizare	LH, FSH, HCG, TSH
Alterare prin formarea dimerilor	Oxitocina, vasopresina, calcitonina
Alterare prin formarea polimerilor	Glucagonul, insulina
Alterare prin comutare de la α-aspartil la β-aspartil a peptidelor mici	Angiotensina I, II, secretina
Erori de sinteză în sinteza protidelor	ACTH
Erori de sinteză cu formarea stereoizomerilor racemici	Dimeri paraleli și antiparaleli ai oxitocinei ; prostaglandinele de sinteză

dozare de către produsele care conțin amestecuri de antigene prin prezența antigenelor care dau reacții încrucișate cu antiserul poate fi evitat combinînd în mod adecvat unele tactici care s-au dovedit utile [10].

Specificitatea sistemului de dozare. În evoluția specificității sistemelor de dozare radioimunologică distingem două generații de tehnici :

— generația I cuprinde sisteme de dozare care nu sesizează diferențe între molecule fiziologice, precursori, fragmente sau forme patologice ;

Scanned with OKEN Scanner

aici se încadrează majoritatea sistemelor de dozare ale insulinei, LH, FSH, disponibile comercial;

— generaţia II cuprinde sisteme diferenţiate pentru hormonii fiziologici şi pentru precursorii lor, de exemplu insulina-proinsulina sau pentru subunităţi hormonale ca β-HCG, β-LH, β-FSH.

Pentru a valida specificitatea unui sistem de analiză, sînt necesare unele măsuri preventive. Asigurarea că sistemul este adecvat pentru dozarea substanţei pe care intenţionăm să o analizăm se poate rezolva prin:

— precizarea substanţelor care pot interfera în sistem;

— cunoaşterea concentraţiei la care substanţele perturbatoare dau reacţii încrucişate şi relaţia dintre aceste concentraţii şi sensibilitatea sistemului pentru substanţa pe care o analizăm;

— testarea paralelismului curbelor doză-răspuns ale substanţei de dozat şi ale substanţelor parazite.

Căile pentru ameliorarea specificităţii sistemelor de dozare vizează: antiserul, amestecul de antigene supus analizei şi trasorul radioactiv, după cum se arată în cele ce urmează:

— prepararea unui antiser adecvat prin selecţionarea unui antiser cît mai specific, prelucrarea antiserurilor mai puţin specifice prin fracţionare sau absorbţie (de exemplu un antiser obţinut prin imunizare cu insulină care conţine şi proinsulină poate fi făcut specific pentru proinsulină după absorbţia cu insulină pură); folosirea pentru imunizare a fragmentelor specifice, de exemplu subunităţile beta pentru LH, FSH sau HCG;

— fracţionarea probei de dozat de exemplu prin cromatografie pe gel de dextran pentru a separa big ACTH de ACTH sau proinsulina de insulină;

— reducerea reacţiei încrucişate prin folosirea fragmentelor specifice pentru marcare, ca de exemplu subunităţile beta ale LH.

Dacă substanţa pe care o dozăm s-ar afla în formă pură, stabilă şi disponibilă în cantităţi suficiente, atunci obţinerea unui preparat de referinţă nu ar mai fi necesară. Eterogenitatea formelor moleculare în amestecuri de diferite concentraţii în lichidele biologice solicită folosirea unor preparate standard cu caracteristici definite cel puţin biologic şi imunochimic.

3.1.3. SELECŢIA ŞI ELABORAREA STANDARDELOR

Termenul de „standard" poate fi aplicat numai substanţelor de referinţă ideale, adică unei probe din substanţa „pură" pe care dorim să o măsurăm şi care este disponibilă, bine caracterizată, necontaminată cu compuşi care pot interfera şi stabili în cursul diferitelor operaţii. Pentru dozarea polipeptidelor nu dispunem de standarde ideale (ca în cazul steroizilor), iar standardelor folosite pentru cantificarea lor şi care prezintă abateri de la condiţia ideală li se aplică uneori termenul de „preparat de referinţă". Practic, un preparat de referinţă este o probă dintr-un material considerat adecvat pe baza cunoştinţelor asupra preparatelor existente în momentul elaborării sale, asemănător (dacă nu identic) cu substanţa de dozat şi suficient de stabil şi de maniabil în condiţii uzuale de lucru.

Preparatele de referinţă folosite în RIA sînt preparate comune (internaţionale, naţionale sau regionale) şi preparate de laborator calibrate faţă de primele.

Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea abaterilor acestor preparate de la condiţia ideală sînt generate de neidentitatea între loturi a produselor obţinute prin extracţie sau prin sinteză. De exemplu, există diferenţe de la un lot la altul în conţinutul de hidraţi de carbon al hormonilor glicoproteici, iar diferitele loturi de oligopeptide obţinute prin sinteză sînt variabil contaminate cu peptide greşite sau cu izomeri.

Preparatele de referinţă uzuale sînt extracte glandulare brute, plasmă care conţine concentraţii mari din substanţa de dozat, sau produse de sinteză. Cu metodele actuale, o *caracterizare* exhaustivă a acestor preparate nu este posibilă, metodele biologice nefiind capabile să detecteze forme aberante.

La elaborarea unui preparat de referinţă se ţine seama de unele condiţii esenţiale :

— identitatea sau cel puţin similitudinea cu substanţa pe care o dozăm, testată prin paralelismul curbelor doză-răspuns ;

— absenţa contaminanţilor care pot interfera cu specificitatea sistemului este testată pe două căi : sisteme cu antiseruri diferite şi acelaşi preparat de referinţă ; sisteme cu acelaşi antiser dar cu preparate de referinţă diferite, eventual obţinute prin procedee chimice diferite ;

— să fie solubil în diluentul folosit în sistemul de dozare ;

— să fie chimic stabil, de exemplu pot apărea modificări (detectabile prin metode fizicochimice) datorate umidităţii, oxigenului, enzimelor proteolitice ;

— să poată fi distribuit în porţii mici omogene ;

— să fie stabil în timpul transportului, al conservării în condiţii de laborator şi al lucrului.

Istoricul unui preparat de referinţă cuprinde punerea la punct a metodei de elaborare, aplicarea sa în cîteva laboratoare specializate. folosirea curentă şi compararea rezultatelor mai multor laboratoare,

3.1.4. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Exprimarea ideală a rezultatelor unei dozări (biologice sau imunochimice) ar fi în echivalenţi de masă sau moleculari, ceea ce nu este posibil decît pentru substanţe bine caracterizate din punct de vedere fizicochimic.

Practic, exprimarea activităţilor relative ale diferitelor substanţe dozate se face în termeni de *masă* sau în termeni de *unităţi*. Comisia de experţi în standarde biologice a OMS recomandă ca ori de cîte ori s-a stabilit unitatea biologică pentru un preparat de referinţă, activităţile relative ale diferitelor substanţe să fie exprimate în unităţi cu specificarea metodei folosite : imunodozare sau biodozare. Exprimarea în unităţi biologice are avantajul că se pot transfera direct estimări ale activităţii de la un preparat la altul, fără a recurge la factori de conversiune. Totuşi, în acest sistem de notaţie nu pot fi comparate cantităţile relative ale diferitelor materiale în termeni de masă sau de concentraţie moleculară [5]. Acest inconvenient era inevitabil ţinînd seama că, pentru necesităţi practice, s-a recurs la standarde înainte de a se cunoaşte structura chimică a hormonului pur care este dozat. Aşadar, apare prematură corelarea dintre unităţile biologice şi masa sau concentraţia moleculară [5], dar sînt în curs cercetări privind elucidarea structurii substanţelor care sînt dozate imunochimic.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru multe substanţe care se dozează prin metode radioimunologice s-a stabilit un sistem de unităţi în care unitatea de reactivitate imunologică a antigenelor — notată cu *imm* — şi unitatea de activitate biologică — notată cu *bion* — [18] ar trebui să se refere, cel puţin pentru un standard primar, la aceeaşi cantitate. Din recomandările OMS rezultă că unităţile internaţionale pentru dozări radioimunologice (sau imunochimice) trebuie să fie stabilite pe baza activităţii biologice a unui standard existent. Rezultă că numărul de unităţi atribuit unui standard OMS pentru imunodozare (imm) trebuie să fie echivalent cu numărul de unităţi pe care acesta îl conţine prin biodozare (bioni) [5].

Indiferent de modalitatea de exprimare a rezultatelor comparativ cu un preparat de referinţă, problema principală este ca acesta să existe, să fie disponibil în cantităţi suficiente şi să fie judicios utilizat.

3.1.5. UTILIZAREA PREPARATELOR DE REFERINŢĂ ÎN LABORATOARELE DE RUTINĂ

Exceptînd preparatele de referinţă conţinute în trusele RIA comerciale şi care obişnuit sînt preparate locale calibrate faţă de cele internaţionale, cercetătorul sau practicianul folosesc preparate internaţionale (primare) recunoscute de OMS şi preparate locale (naţionale sau regionale) sau preparate de laborator calibrate faţă de cel primar.

În anul 1968 comisia OMS a experţilor în standarde biologice constată că standardele biologice nu sînt adecvate pentru dozările radioimunochimice şi iniţiază aprovizionarea laboratoarelor cu preparate de referinţă adecvate acestor metode.

Preparatele standard disponibile pot fi clasificate în trei categorii:

— antigene foarte purificate, bine caracterizate şi, dacă este posibil, omogene, derivînd de la aceeaşi specie cu substanţa pe care o măsurăm. Acestea sînt standardele de elecţie şi această categorie include insulina umană şi hormonul de creştere uman. Uneori pot fi folosite şi substanţe de la altă specie decît a substanţei de măsurat cu condiţia ca sistemul de dozare să nu poată face o distincţie între ele. Sînt discuţii dacă preparatele de sinteză care conţin uneori peptide greşite pot fi incluse în această categorie;

— antigene parţial purificate, incomplet caracterizate, pot fi folosite ca standarde temporare pînă la obţinerea unor preparate din prima categorie;

— plasmă totală, extracte brute de glande sau de urină, antigene bacteriene sau virale pot fi de asemenea folosite pentru comparaţie în RIA, în special în stadiile iniţiale ale dezvoltării unei tehnici.

Preparatele oferite gratuit sînt prezentate în formă liofilizată, în fiole însoţite de fişa informativă şi de instrucţiuni de folosire. Ţinînd seama de dificultăţile de elaborare a unor astfel de preparate, sînt necesare măsuri pentru utilizarea lor judicioasă. După deschiderea fiolei şi diluarea la concentraţii de aproximativ 200 μg/ml, de preferat în soluţii neproteinate pentru a evita contactul cu enzime care pot contamina unele proteine, se conservă la temperaturi de sub —20° C, în porţii mici suficiente pentru o singură folosire pentru a evita congelarea şi decongelarea repetată. Congelarea rapidă a standardului în soluţie ar trebui să se facă la temperaturi

Scanned with OKEN Scanner

mult sub punctul eutectic al diluentului, chiar dacă ulterior preparatul congelat este conservat la temperaturi mai ridicate (de exemplu, punctul eutectic al serului fiziologic este la aproximativ —23°C), dar acest procedeu nu este totdeauna accesibil.

Preparatul de referinţă primar este folosit fie direct în fiecare dozare, atunci cînd este disponibil în cantităţi suficiente, fie numai pentru calibrarea unui preparat de laborator (extract glandular brut sau plasmă). Stabilitatea în timpul conservării este urmărită prin includerea în fiecare dozare a probelor de control : creşterea în timp a valorilor obţinute pentru aceste probe faţă de valorile obţinute cu preparatul de referinţă proaspăt indică pierderea activităţii acestuia, cu condiţia ca toţi parametrii dozării să fie identici. Observaţiile obţinute în laborator asupra stabilităţii preparatelor de referinţă sînt comunicate la sursă.

3.2. LICHIDELE ŞI ŢESUTURILE BIOLOGICE

Deşi scopul comun al radioanalizelor hormonale este investigarea materialului biologic, particularităţile care apar odată cu dozarea fiecărui hormon nu permit generalizări prea extinse.

Prin radioimunoanaliză şi procedeele înrudite se determină în primul rînd hormonii şi alte substanţe în sînge. Dozarea acestor substanţe în sînge nu a fost posibilă nici prin metodele biologice, nici prin cele chimice. Rare excepţii, de exemplu dozarea ACTH prin metoda biologică, necesită un volum de 30 ml sînge heparinizat [19], spre deosebire de microvolumele utilizate în metodele radiochimice. În tabela 3.2 sînt redate materialele biologice utilizate şi metodele de prelevare, prelucrare şi conservare. Se poate observa că, în afara recoltărilor pe cale chirurgicală, obţinerea, prelucrarea şi conservarea probelor nu necesită instalaţii speciale. Unele dificultăţi apar totuşi la recoltarea probelor seriate pentru cercetarea ritmicităţii circadiene sau în cursul probelor dinamice (de ex. hiperglicemia provocată, proba la insulină, proba la releasing factori etc.). În aceste situaţii s-a recurs la cîteva variante, nici una pe deplin satisfăcătoare :

— puncţionarea repetată a venei este stresantă pentru pacient, cu repercusiuni asupra valorilor unor hormoni ;

— folosirea acelor de venepuncţie siliconate : nu întotdeauna se poate evita coagularea sîngelui pe ac după 1—2 ore de la inserţie ;

— transfuzie lentă cu un lichid anodin : imobilizează pacientul ;

— catetizarea venei este un procedeu chirurgical rareori acceptat de pacient ;

— tehnica de pompare continuă necesită un aparat costisitor, valorile obţinute sînt valori integrate necomparabile cu celelalte tipuri de prelevări care sînt de fapt „secţiuni" în timp ; are însă avantajul că pacientul nu este stînjenit în activitatea sa şi poate fi investigat în cursul diferitelor tipuri de efort.

Hormoni ca de exemplu ACTH, angiotensina, gastrina sau unii steroizi, sînt dozaţi în plasma heparinată cu aproximativ 10 UI/ml sînge [20, 21]. În general, în RIA se pot folosi şi serul şi plasma. Totuşi, şi într-un caz şi în altul există unele probleme. Folosirea pentru dozare a serului favorizează eliberarea enzimelor proteolitice din hematii în intervalul necesar pentru formarea chiagului. Aceste enzime pot distruge antigenul endogen atît în intervalul de formare a chiagului, cît mai ales în timpul

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 3.2

Materiale biologice folosite pentru dozarea hormonilor prin metode RIA : recoltare, prelucrare, conservare

Materialul biologic	Mod de prelevare	Prelucrare	Lichidul rezultat	Conservare
Sînge	venă periferică vena portă vena suprarenală } chirurgical cordon ombilical la naştere puncţie călcîi la nou-născuţi	cu anticoagulant şi/sau vase siliconate, centrifugare după 15—20 min fără anticoagulante, separare prin centrifugare după aprox. 2 ore	plasmă ser	Congelare sub — 20°C cu decongelare rapidă în momentul folosirii
Urină	din 2 sau 24 ore	ajustare pH, dializă, centrifugare, diluare în tampon	urină sau extract (conservabil şi la + 4°C)	
Lichid amniotic	amniocenteză în condiţii bine controlate	fără prelucrare	lichid amniotic sau extract	
LCR	puncţie lombară puncţie suboccipitală puncţie în fontanelă (nou născut, embrion)	neprelucrat	LCR	
Bilă	tubaj sau intraoperator	centrifugare dializă	bilă	
Spermă	post coitum sau masturbare	centrifugare	lichid seminal	
Secreţie lactată	mulgere manuală sau cu pompa	centrifugare degresare	secreţie galactoreică, lapte, colostru	
Salivă	stimulare cu acid citric	centrifugare	lichid salivar	
Ţesut glandular placentă ţesut tumoral	intraoperator, avort, naştere, necropsie	triturare, omogenizare în soluţii selecţionate în funcţie de hormon, centrifugare	omogenat de ţesut	

conservării dacă serurile sînt numai răcite la +4°C, nu congelate. În plus, ele pot degrada antigenul marcat în timpul incubărilor. Cînd se foloseşte plasma, pot apărea efecte nedorite ale substanţelor anticoagulante asupra sistemului imunitar implicat în RIA. Astfel, concentraţiile mari de heparină pot scade, în unele radioimunodozări, legarea antigenului marcat de anticorp [21]. S-a demonstrat că concentraţia hormonală este mai mare în

Scanned with OKEN Scanner

plasma heparinată decît în ser [20]. Heparina este un polianionit puternic şi poate mima efectele unor electroliţi, inhibînd reacţia antigen-anticorp [21] la concentraţii de peste 20 U/ml, dar aceste efecte dispar la concentraţii de 10 U/ml în mediul de incubare. Aceste concentraţii reduse se pot realiza folosind heparină cu o concentraţie de 1000 U/ml numai pentru a tapeta siringa, de exemplu 0,1—0,2 ml heparină (deci 100—200 U) pentru 10 ml de sînge. De aceea, ori de cîte ori necesităţile privind sensibilitatea sistemului permit, pentru a evita interferenţa substanţelor anticoagulante sau a altor substanţe prezente în plasmă, dozarea se face cu diluţii de plasmă de 1 : 10 pînă la 1 : 25. Caracterul anionic al heparinei mai poate interfera în procesul de adsorbţie al unor peptide foarte acide (de exemplu gastrina) pe schimbători de ioni bazici [21].

Tehnica de dozare este mult mai simplă dacă se folosesc lichide biologice ca atare, neprelucrate. Sensibilitatea redusă a tehnicii (dozarea octapeptidelor sau ACTH) sau prezenţa unor substanţe care interferează în reacţie (dozarea steroizilor) fac necesară prelucrarea prealabilă a plasmei, urinii sau a LCR, procedee care complică şi prelungesc durata dozării. În plus, în timpul procedeelor de extracţie au loc pierderi ale substanţei de dozat şi uneori se impun procedee suplimentare pentru calculul recuperării.

La recoltarea probelor de sînge este necesar să se ţină seama de variaţiile circadiene ale substanţei pe care intenţionăm să o dozăm, de ritmul alimentaţiei, de conţinutul alimentelor, de medicaţia administrată, de starea de repaus sau de stress.

Folosirea urinii ca material destinat dozării necesită investigarea prealabilă a funcţiei renale, ţinînd seama că toţi hormonii cunoscuţi au greutăţi moleculare sub pragul de traversare a filtrului renal [22—27].

Dozarea hormonilor în lichidul cefalorahidian (LCR) prezintă interes deoarece vehiculează substanţe biologic active în zone cu formaţiuni nervoase importante. În cazuri patologice (tumori hipofizare) au fost puse în evidenţă valori crescute ale unor hormoni hipofizari în LCR [28—31].

Inconvenientele care apar în dozarea hormonilor peptidici în diferitele compartimente (glandă, sînge, LCR, urină) reies din imposibilitatea de a efectua cantificarea cu ajutorul unui standard omolog (glandă-glandă, sînge-sînge, LCR—LCR, urină-urină) cu unele excepţii. Dealtfel, aşa cum s-a arătat, acest inconvenient a permis punerea în evidenţă a formelor eterogene ale hormonilor în plasmă [32—34].

Prelucrarea ţesutului glandular sau tumoral se face în funcţie de hormonul căutat. În general, ţesuturile sînt recoltate intraoperator sau la necropsie şi îngheţate imediat prin congelare rapidă la —80°C şi apoi conservare sub —25°C. Nu se cunosc studii asupra vitezei de degradare a hormonilor după deces [35]. Ţesutul prelevat este tăiat în stare congelată în felii subţiri şi omogenizat la 4°C la o concentraţie de aproximativ 100 mg/ml solvent adecvat hormonului cercetat. Omogenatul este centrifugat la turaţie mică la +4°C şi supernatantul este supus dozării ca atare sau fracţionat prin cromatografie.

3.3. MEDIUL DE INCUBARE

Într-un sistem radioimunologic concentraţia antigenului (marcat şi rece) şi a antiserului sînt foarte reduse, condiţii care duc la efecte nedorite, cum sînt adsorbţia antigenului pe pereţii eprubetei, polimerizarea lui în timpul incubărilor, infectarea mediului prin prezenţa lichidelor biologice

Scanned with OKEN Scanner

nesterile, distrugerea enzimatică în special a hormonului marcat, modificări ale pH-ului lichidelor biologice etc. De aceea, compoziţia adecvată a mediului de incubare îşi are importanţa sa în cursul desfăşurării dozărilor. Mediul de incubare în RIA conţine un sistem tampon şi factori de protecţie.

Sistemele tampon sînt caracterizate prin natura ionilor şi prin concentraţia lor dată în termeni de forţă ionică şi pH. În RIA cu greu se pot face generalizări din cauza proprietăţilor diferite ale diferitelor antiseruri şi antigene, totuşi, în majoritatea sistemelor de dozare sînt folosite sisteme tampon uşor alcaline cu pH = 7,4—8,6 şi forţă ionică redusă, de exemplu între 0,01 şi 0,05 M, deoarece s-a observat că concentraţiile mari în săruri pot interfera cu reacţia antigen-anticorp. Sistemele tampon sînt folosite în RIA pentru diluarea următorilor reactivi: hormonul marcat, antiserul, substanţa de referinţă, proba necunoscută şi, de multe ori, agentul de separare (de ex. al doilea anticorp, cărbune-dextran) şi, de asemenea, în unele dozări, sînt folosite pentru spălări după incubare. Printre sistemele tampon uzuale menţionăm: tampon fosfat 0,04—0,05 M, pH = 7,4—7,6, tampon veronal sodic 0,1 M, pH = 8,6, tampon borat 0,1 M, pH = 8,4, tampon Tris 0,2 M, pH = 7,5—8,0 (tabela 3.3).

Unele sisteme RIA par să facă excepţie de la regula generală a pH-ului uşor alcalin şi anume în RIA cAMP, legarea ciclic AMP de serul anti-cAMP scade la pH alcalin, fiind maximă la pH cuprins între 4 şi 6, nu sub 3, probabil prin instabilitatea cAMP în mediu neutru şi alcalin [36].

TABELA 3.3

Sisteme tampon folosite în RIA

Sistem tampon	Tehnica de separare	RIA Hormoni
Fosfat 0,04 M, pH = 7,4 — 7,6 proteinat + mertiolat Na ± NaCl 0,15 M ± EDTA	dublu anticorp	HGH, TSH, Prolatina, Insulină, HCG, Gastrină, TRH
	PEG (polietilenglicol)	ACTH
	cărbune-dextran	estrogeni: Estradiol, Estronă, Estriol, Progesteronă, Testosteronă
Veronal 0,1—0,05 M, pH=8,6 proteinat ± Trasylol	cromatoelectroforeza	Insulină
	cărbune-dextran	HPL, Parathormon, T_3, T_4
Tris 0,1—0,2 M, pH = 7,3—7,5 proteinat, ± mertiolat Na	cărbune-dextran	LH—RH, Calcitonină
Borat 0,1—0,075 M, pH=8,0 proteinat	dublu anticorp	Secretină
	cărbune-dextran	mineralocorticoizi: Aldosteronă, desoxicorticosteronă; Glucocorticoizi: Cortisol, Corticosteronă, compus S
Glicină 0,2 M, pH=8,8 albuminat	cărbune-dextran	Glucagon

Sistemul tampon este selecţionat atît în funcţie de calităţile antiserului şi ale antigenului, cît şi în funcţie de tehnica de separare a complexelor antigen-anticorp de antigenul liber [36]. De exemplu, pentru separarea electroforetică se foloseşte tamponul veronal, pentru separarea cu dublu anticorp, exceptînd dozarea gastrinei, este indicat tamponul fosfat, iar pentru metodele care folosesc adsorbanţi se foloseşte tampon borat. Deşi, în general, sînt folosite sisteme tampon cu forţă ionică joasă, totuşi, s-a arătat [37] că pH-ul probelor de ser, care se ştie că prezintă variaţii individuale, are tendinţa să vireze spre alcalin după îngheţ şi

Scanned with OKEN Scanner

dezgheţ. Aceste observaţii sugerează măsuri de standardizare a pH-ului probelor biologice şi în special al probelor de ser folosind sisteme tampon capabile să menţină constant pH-ul serului, iar pentru serurile de control sau serurile standard se recomandă dializa prealabilă [37].

Încărcarea electrică a antigenului poate să solicite folosirea tamponului salin, aşa cum s-a arătat pentru insulină, a cărei electronegativitate ar fi sporită prin prezenţa ionului Cl^- crescînd rata formării complexelor antigen-anticorp [38], deşi practica arată că nu este obligator.

La prepararea sistemelor tampon pentru RIA unele precauţii sînt absolut necesare. Printre acestea sînt controlul calităţii sărurilor şi folosirea apei bidistilate sau deionizate. Exceptînd tamponul borat, care este antiseptic prin el însuşi, în toate celelalte sisteme tampon se foloseşte un conservant, ca azida sau mertiolatul de sodiu 0,1—0,2 g/l.

Concentraţia redusă a reactivilor folosiţi în RIA este corectată prin îmbogăţirea sistemelor tampon în proteine ca : serumalbumină (bovină sau umană), gelatină sau lizozim. Rolul acestor proteine este multiplu : împiedică absorbţia antigenului pe pereţii eprubetelor de incubare, menţinînd astfel reactivii în mediul de reacţie ; au rol de prevenire a efectelor radiolizei (rol de „gunoier") şi rol de purtător al antigenului aducîndu-l cu situsurile reactive în vecinătatea locurilor de legare ale anticorpului ; previn polimerizarea antigenului probabil prin unele legături laxe la nivelul situsurilor sale reactive [38]. Gradul de puritate al serumalbuminei este esenţial pentru dozarea acelor hormoni care pot fi legaţi competitiv de globuline serice (T_3, T_4, unii hormoni steroizi). În lipsa serumalbuminei eliberată complet de fracţiuni globulinice se poate folosi gelatina care este şi ieftină sau lizozimul (mai greu de procurat).

Concentraţia proteică folosită este variabilă în funcţie de scop dar şi de proteină. Astfel, serumalbumina bovină în concentraţii de 0,1 g/100 ml tampon este utilă pentru diluarea anticorpului şi a hormonului marcat, concentraţia crescînd mult (de 40—50 de ori) în soluţiile de spălare. Aceste concentraţii mari fac costisitoare analiza şi atunci serumalbumina este înlocuită cu ser de cal v/v în tampon.

Pentru diluarea probelor de plasmă se folosesc uneori tampoane saline izotonice (cu NaCl 9 g/l), dar concentraţii mari de NaCl inhibă uneori reacţia antigen-anticorp.

Prezenţa serumalbuminei în soluţia tampon reduce durata de conservare a tamponului la cîteva zile, ceea ce face imposibilă folosirea tampoanelor în soluţie în trusele de dozare livrabile la distanţă. S-a recurs de aceea la liofilizarea tampoanelor albuminate, dar unele modificări care apar prin liofilizare au dus la o altă variantă şi anume tampoane granulate, adică sărurile şi albumina sînt adăugate în cantităţile cuvenite rămînînd ca în momentul folosirii să se adauge apa dar să se ajusteze şi pH-ul. Totuşi, tampoanele albuminate liofilizate sînt azi cel mai larg folosite în trusele RIA.

Hormonii expuşi degradărilor enzimatice în timpul incubărilor [39] sînt protejaţi cu ajutorul agenţilor blocanţi ai enzimelor ca Trasylolul, acidul 6-aminocaproic sau marcaptoetanolul. De exemplu, dimercaprolul şi sulfatul de 8-hidroxichinolină inhibă enzima de conversie şi activitatea angiotensinazei în dozarea angiotensinei [40], iar cistina şi fenantrolina întîrzie degradarea oxitocinei [41]. Alteori este necesar să adăugăm inhibitori ai legării hormonului de unele proteine plasmatice, de exemplu acid 8-anilin-1-naftalen-sulfonic în RIA T_3 şi T_4 [42].

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a reduce degradarea prin incubare cu ser sau plasmă a hormonului marcat, cînd concentraţia plasmei în mediul de incubare este mai mare de 1 : 10 sau cînd hormonul marcat este mai instabil se adaugă mediului agenţi protectori. Aceştia sînt fie inhibitori enzimatici, fie soluţii proteinate în care enzimele au fost distruse. În sistemele de dozare a ACTH se adaugă mediului de incubare mercaptoetanolul în concentraţie de 0,5%, în dozarea parathormonului şi a glucagonului se foloseşte Trasylol 500 UI pe mililitru de mediu sau Trasylol 500 UI cu 12,5 mg de acid aminocaproic pentru 1 ml de incubat, la dozarea calcitoninei [21].

Complementul a fost acuzat că ar avea un rol în perturbarea reacţiilor antigen-anticorp, de aceea se adaugă uneori EDTA în mediul de incubare. Totuşi, s-a arătat că EDTA poate produce inhibiţia nespecifică a reacţiei antigen-anticorp.

Stabilitatea şi uniformitatea mediului de incubare pot fi grav perturbate şi de reziduurile solvenţilor organici folosiţi pentru extracţia lichidelor sau ţesuturilor biologice în dozarea unor hormoni care necesită separări prealabile, cum sînt hormonii steroizi, ACTH etc.

Studiile de standardizare [43] au arătat că aceşti solvenţi diferă cu furnizorul şi cu şarja chiar la acelaşi furnizor. Aceste diferenţe modifică substanţial valoarea blancului în dozarea steroizilor. De aceea, pînă la crearea reactivilor speciali pentru imunochimie (un deziderat al viitorului), fiecare nouă tranşă de solvent trebuie controlată. Deocamdată se recomandă, în lipsa altor trepte superioare de puritate, folosirea solvenţilor „reagent — grade".

În concluzie, selecţionarea soluţiilor tampon se face prin experimentare, iar reactivitatea imunologică a unui nou sistem se testează în diferite soluţii tampon cu pH şi forţă ionică diferite.

Mediul de incubare inadecvat poate perturba reacţia antigen-anticorp, separarea complexului antigen-anticorp de antigenul liber, panta curbei standard, sensibilitatea, exactitatea şi precizia rezultatelor dozării, aşadar întreg procesul de dozare.

3.4. TEHNICI DE SEPARARE A ANTIGENULUI LEGAT LA ANTICORP DE ANTIGENUL MARCAT LIBER

În condiţiile unui sistem de radioimunoanaliză a hormonilor în plasmă, concentraţia reactivilor este atît de redusă încît complexele antigen-anticorp rămîn în soluţie (nu sînt centrifugabile), de aceea a fost necesară dezvoltarea unor tehnici pentru separarea complexelor solubile de hormonul marcat liber.

O astfel de tehnică trebuie să realizeze separarea completă şi rapidă a antigenului legat la anticorp de antigenul marcat liber, astfel încît să poată fi măsurată corect radioactivitatea fie a uneia, fie a ambelor compartimente. Procedeele de separare care favorizează asocierea sau disocierea reactivilor după terminarea fazelor de incubare aduc mari prejudicii preciziei dozării. O metodă de separare corectă trebuie să fie reproductibilă, maniabilă şi economică.

Prin tehnici de separare înţelegem o categorie de procedee de laborator destinate separării unor molecule mari — complexele Ag—Ac — de molecule mai mici — Ag liber.

Scanned with OKEN Scanner

O tehnică ideală ar trebui să realizeze separarea perfectă a complexului Ag—Ac de Ag liber, iar radioactivitatea măsurată pentru fiecare din cele două compartimente ale sistemului să le reprezinte strict. În practică însă nu există o tehnică universal aplicabilă oricărui sistem Ag—Ac, nici perfectă din punctul de vedere al separării.

TABELA 3.4

Tehnici folosite în RIA pentru separarea antigenului legat la anticorp (complexul Ag—Ac) de antigenul marcat liber. Criteriul de clasificare: componenta sistemului RIA vizată de tehnica de separare

I. Adsorbția *antigenului* liber pe adsorbant insolubil
- A. Celuloză pulbere ca atare sau împachetată în coloane
- B. Cărbune
  1. neîncărcat
  2. încărcat cu dextran, albumină, ficoll, polivinil-pirolidonă, gelatină, hemoglobină etc.
- C. Silicați
  1. talc — pulbere sau tablete
  2. gel de siliciu precipitat (Quso)
  3. acid silicic
  4. pământuri activate: caolin, bentonită
- D. Rășini schimbătoare de ioni
  1. rășini anionice
  2. rășini cationice
- E. Diverse
  1. materiale pe bază de alumină
  2. materiale pe bază de magnezie
  3. florizil
  4. latex
  5. gel de poliacrilamidă

II. Izolarea *complexelor Ag—Ac*
- A. Tehnici chimice de precipitare
  1. precipitare cu săruri: sulfat de sodiu; sulfat de amoniu
  2. fracționare cu solvenți organici: alcool ± NaCl; alcool + acetat de amoniu; dioxan; acetonă
  3. separare prin precipitarea Ag—Ac cu polimeri solubili în apă: polietilenglicol (Carbowax)
- B. Tehnici imunochimice
  Tehnica cu dublu anticorp

III. Separarea în fază solidă prin fixarea *anticorpului*
- A. Conjugarea covalentă a anticorpului cu polimeri de hidrați de carbon: dextran; celuloză (pulbere sau discuri)
- B. Adsorbția *anticorpului* pe materiale plastice (polistiren): eprubete, plăci cu godeuri, discuri, sfere
- C. Anticorp polimerizat
- D. Complexarea anticorpului pe particule feromagnetice

IV. *Mixte* (migrare diferențiată a celor 2 compartimente, precipitare Ag—Ac)
- A. Electroforeză: celuloză-hîrtie; acetat de celuloză; gel de agar, de amidon, de poliacrilamidă
  Cromatoelectroforeză
  Cromatografie ascendentă uscată
- B. Partiție (sită inversă)
- C. Proteoliza enzimatică a Ag liber urmată de precipitarea Ag—Ac cu acid tricloracetic

Scanned with OKEN Scanner

Selecţia unei tehnici de separare pentru un anumit sistem Ag—Ac are în vedere natura, mărimea moleculară, încărcarea şi solubilitatea Ag şi titrul Ac.

Tabela 3.4 arată diversitatea tehnicilor folosite pentru separarea antigenului legat la anticorp de antigenul marcat liber. Diversificarea atît de mare a acestor tehnici este rezultatul imaginaţiei şi îndemînării cercetătorilor dar şi al necesităţii [44]. O singură tehnică de separare nu este suficientă din multiple cauze : diversitatea proprietăţilor chimice ale antigenelor marcate, titrul antiserului, numărul variabil al probelor din seria de lucru (zeci, sute, mii), unele exigenţe particulare ale truselor comerciale diferite de procedeele uzuale, unele necesităţi legate de automatizare ş.a.

Folosind ca bază de clasificare componenta sistemului RIA vizată de tehnica de separare, distingem patru mari clase de tehnici (tabela 3.4). Fiecare din tehnicile cunoscute au avantaje dar şi limitări şi dezavantaje (tabela 3.5).

TABELA 3.5

Avantaje şi dezavantaje ale tehnicilor de separare

Avantaje	Dezavantaje
A. Separarea prin migrare diferenţiată a hormonului marcat (*H) legat, de cel liber	
Procedeu analitic, permite examinarea proprietăţilor *H, utile pentru studiul metabolismului hormonal şi al alterării *H în timpul procedeului RIA	Consumă timp, deci greu aplicabile seriilor mari. Nu sînt procedee de rutină
1. Cromatoelectroforeza	
Permite aprecierea calităţii *H şi corecţia pentru fracţiunea alterată în fiecare probă. Folosind ca metamer de răspuns raportul B/F manevrele strict cantitative sînt evitate. Recomandabilă ca tehnică de referinţă pentru separarea optimală a *H legat de cel liber	Consumă timp şi ocupă spaţiu ; supusă variaţiilor date de diferitele loturi de hîrtie ; susceptibilă la erorile datorate *H alterat. Aplicabilă numai Ag care se adsorb adecvat pe hîrtia cromatografică. Volumul aplicat pe o bandă fiind mic, AS a *H trebuie să fie suficientă pentru a asigura citirea corectă a radioactivităţii
2. Electroforeza	
Nu are avantaje speciale faţă de alte tehnici	Nu este larg folosită
3. Filtrarea în gel	
Analitică	Consumă timp ; fracţiunile finale nu au volume convenabil de mici pentru a fi citite
4. Cromatografia	
Relativ simplă	Nu are aplicabilitate largă
B. Adsorbţia hormonului marcat liber	
Una din cele mai convenabile, cu aplicabilitate majoră pentru Ag cu *GM* mică şi cu afinitate mare pentru adsorbant	
1. Cărbune-dextran	
Tehnică convenabilă, simplă, rapidă, reproductibilă, permite precizie şi sensibilitate mare. Optimă pentru Ag cu *GM* mică : h. tiroidieni şi steroizi, vit. B_{12} şi peptide mici. A fost folosită şi pentru HGH, HPL, TSH, FSH	Poate disocia complexul *H legat în special în sisteme cu reactiv de legare natural (proteine serice sau tisulare) dacă nu se aplică unele măsuri de prevenire, limitată la Ag mici şi medii. Distribuţia manuală nu permite serii de dozare mai mari de 100 de probe

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabela 3.5

Avantaje	Dezavantaje
2. Silicaţi	
Utili pentru peptide mici şi mari (gruparea bazică se leagă de gruparea acidă a adsorbantului), dar şi pentru purificarea *H prin adsorbţie urmată de eluţie *acidă*)	Adsorbantul trebuie tabletat: cîntărirea sau distribuţia cu mensuri furnizează un supliment de erori
3. Schimbători de ioni	
Folosiţi pentru Ag a căror încărcare nu permite legarea de alţi adsorbanţi : ex. peptidele acide ca gastrina este rapid captată de răşini anionice	Folosirea limitată
4. Alţi adsorbanţi	
C. Precipitarea complexelor Ag—Ac	
1. Precipitarea chimică a imunoglobulinelor cu : sulfat de sodiu sau de amoniu, cu dioxan, polietilenglicol ; clorură de sodiu în etanol sau proteoliza enzimatică a Ag liber urmată de precipitarea complexului Ag—Ac cu acid tricloracetic	
Utilă pentru molecule mici ca steroizi şi peptide mici	În sistemele cu Ag mari precipită parţial şi Ag marcat liber
2. Precipitarea imunochimică a imunoglobulinelor (tehnica cu dublu anticorp cu 2 variante : preprecipitare şi postincubare)	
Aplicabilă Ag cu orice mărime moleculară şi tuturor antiserurilor indiferent de titru. Oferă precipitarea selectivă a trasorului legat. Se pot efectua serii mari de dozări chiar cu distribuţie manuală	Varianta cu postincubare necesită prelungirea incubării cu minimum 24 ore pentru precipitare completă. Variaţii ale calităţii diferitelor loturi de al doilea anticorp pot genera rezultate variabile ale dozării. În prezenţa trasorului lezat apare precipitarea nespecifică controlabilă cu ajutorul martorilor tampon.
D. Separarea în fază solidă	
Simplitate Reducerea duratei analizei Adecvată pentru procedee în condiţii de dezechilibru imunochimic, pentru automatizare, pentru screening.	Consumă mai mult anticorp decît alte metode. Uneori, variabilitate mare a rezultatelor.

3.4.1. ADSORBŢIA ANTIGENULUI LIBER PE FAZĂ SOLIDĂ

Principiul acestei clase de tehnici constă din separarea prin adsorbţie fizică sau fizicochimică nespecifică pe materiale adsorbante, insolubile, Ag liber adsorbit fiind izolat prin centrifugarea sau sedimentarea adsorbantului a cărui radioactivitate este apoi măsurată. Poate fi măsurată şi radioactivitatea compartimentului Ag legat de Ac, citind supernatantul sau

Scanned with OKEN Scanner

prin calcul scăzînd numărul de impulsuri ale Ag liber din totalul impulsurilor adăugate în sistem.

Materialele folosite în acest scop pot fi grupate în : celuloze, cărbune, silicaţi, răşini schimbătoare de ioni şi diverse.

A. **Celuloze.** Tehnicile care folosesc celuloze se bazează pe adsorbţia Ag liber la locul de aplicare, folosindu-se celuloza sub formă de pulbere ca atare sau în coloane.

B. **Cărbune.** Alături de tehnica cu dublu anticorp, este una din tehnicile de separare cele mai răspîndite, aplicată în special Ag cu greutate moleculară mică : hormoni tiroidieni, vitamina B_{12}, steroizi şi peptide mici.

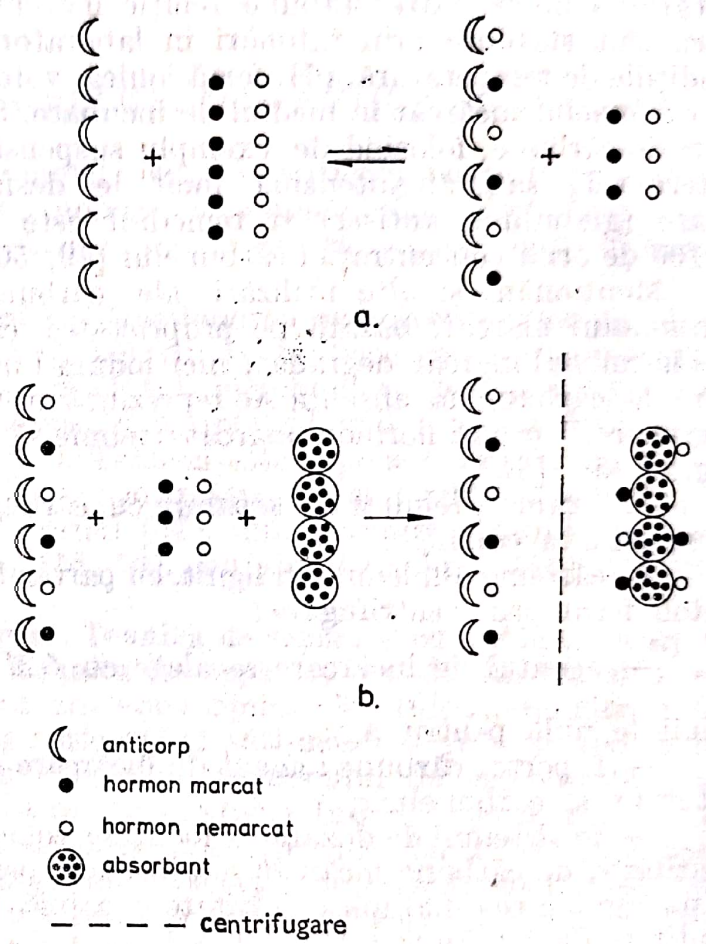


Fig. 3.1. — Reprezentarea schematică a tehnicii de separare cu cărbune-dextran. *a*) incubare; *b*) separare.

Cărbunele vegetal, neutru (care nu modifică pH-ul sistemului de dozare), cu particula de aproape 60 microni este cel mai eficient. El se foloseşte ca atare, tratîndu-l extemporaneu cu un tampon cu conţinut crescut în serumalbumină (ex. 5 g %) sau încărcat în prealabil cu molecule mari.

Teoretic, cărbunele încărcat alcătuieşte un sistem de „dializă extemporanee" pentru separarea unor molecule mici (Ag liber) de molecule mari (complex Ag—Ac) [45] (fig. 3.1). Particula de cărbune poate fi concepută ca un „microburete solid" şi încărcătura sa ca o „sită moleculară" care îmbracă microburetele cu o reţea prin ai cărei pori pot trece numai molecule suficient de mici ca mărime şi configuraţie moleculară [46]. Particulele de cărbune neîncărcate adsorb molecule şi mari şi mici pe suprafaţa lor, pe cînd particulele presaturate cu molecule mari adsorb pe suprafaţa lor numai molecule mici care intră prin pori şi sînt adsorbite pe pereţii canalelor.

Cărbunele încărcat în mod adecvat permite separarea a două substanţe cu greutăţi moleculare şi configuraţii foarte diferite, adsorbind selectiv substanţa cu moleculă mică. Dar substanţele adsorbite pot fi desorbite de pe cărbune [47], aşa cum pot fi desorbite şi de pe alţi adsorbanţi ca gelul de siliciu [48].

Substanţele adsorbite pe cărbune încărcat sînt desorbite proporţional cu forţele de atracţie pentru o anumită substanţă şi cu capacitatea de desorbţie a ingredientelor mediului folosit pentru acest scop. Aceste forţe de atracţie pot fi influenţate de mulţi factori fizici şi chimici ca temperatura, pH, forţa ionică [47]. Întrucît în ceea ce priveşte tehnica de separare cu cărbune nu se poate stabili o relaţie matematică precisă, condiţiile de lucru sînt stabilite prin tatonări în laborator. Experimentările stabilesc condiţiile de temperatură, pH, forţă ionică, volumul de reacţie şi concentraţia cărbunelui încărcat în mediul de incubare. S-a observat că concentraţii mari de cărbune, folosind de exemplu suspensii de 50 mg% leagă atît de puternic T_4 sau angiotensina încît le desface de proteinele lor de legare (globuline, antiser) şi remediul este numai reducerea empirică de 100 de ori a concentraţiei cărbunelui [49, 50].

Menţionăm şi alte utilizări ale cărbunelui: verificarea purităţii hormonului marcat, bazată pe proprietatea cărbunelui de a nu adsorbi nici hormonul marcat degradat, nici iodura liberă. Deci, expunerea trasorului la cărbune în absenţa Ac reprezintă un test rapid al gradului său de degradare. Un bun hormon marcat trebuie să conţină sub 5% fracţiune degradată [51].

În rezumat, tehnica de separare cu cărbune încărcat implică respectarea cîtorva condiţii:

— cărbune din lemn sau lignit, cu particula $\leqslant 60\ \mu$, neutru şi care dă buton ferm prin centrifugare;

— agentul de încărcare se alege cu $GM = \frac{GM(AgAc) - GM(Ag)}{2}$ şi afinitate nulă pentru Ag;

— raportul cărbune: agent de încărcare de 5 : 1 pentru condiţia de saturare a cărbunelui;

— în sistemul de dozare se menţine concentraţie proteică uniformă, cantitatea de cărbune încărcat se ajustează pentru fiecare sistem în parte după regula: cea mai mică cantitate capabilă să adsoarbă cea mai mare cantitate de Ag liber;

— timpul de contact minim pentru cupluri de reactivi cu constante de asociere mici;

— cînd aplicăm separarea cu cărbune încărcat la un nou sistem RIA avem două alternative: fie se acceptă ca suficientă experienţa cu alte sisteme, fie se tatonează cu noul sistem principalii parametri ai tehnicii; adică tipul de cărbune, modul de încărcare, cantitatea, durata optimă de expunere a sistemului la cărbune etc.

C. **Silicaţi.** Diferiţi aluminosilicaţi ca talcul, gelul de siliciu precipitat (Quso G—32), bentonita, caolinul sau acidul silicic, sînt folosiţi pentru adsorbţia Ag marcat liber în sistemele RIA pentru hormonii peptidici şi proteici.

Legarea peptidelor pe silicaţi ca şi pe celuloză se pare că implică grupările bazice ale peptidei şi grupările acide ale adsorbantului. Condiţiile pentru realizarea unei bune separări sînt similare cu cele ale oricărui adsorbant solid şi au fost descrise pe larg pentru separarea cu cărbune.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul silicaţilor, cînd sînt folosiţi în cantităţi mari, este necesar ca înainte de centrifugare, să se adauge un supliment de 2—3 ml de tampon în scopul de a diminua captarea radioactivităţii legate de anticorp.

D. **Răşini schimbătoare de ioni.** Adsorbţia Ag marcat pe răşini schimbătoare de ioni este mult mai lentă decît pe adsorbanţii descrişi mai sus. Tehnica nu este prea răspîndită şi, în general, este folosită numai atunci cînd încărcarea unui Ag îl împiedică să fie legat de către alţi adsorbanţi, ca în cazul peptidelor acide. De exemplu, gastrina nu este adsorbită pe silicaţi sau pe celuloză dar este legată rapid de răşini anionice [52—54].

E. **Alţi adsorbanţi ai Ag marcat liber.** De exemplu florizilul şi materialele pe bază de alumină sau de magneziu, nu sînt folosite frecvent.

3.4.2. IZOLAREA COMPLEXELOR ANTIGEN-ANTICORP

Hormonul (antigenul marcat) legat de anticorp poate fi separat prin metode care precipită imunoglobulinele gama (IgG), adică prin metodele chimice şi imunologice clasice folosite pentru izolarea IgG din serurile imune.

A. **Precipitarea cu săruri şi fracţionarea cu solvenţi organici.** Aceste tehnici aplicate sistemelor RIA pentru Ag proteice cu molecule mari nu asigură o bună separare, precipitatul înglobînd şi porţiuni apreciabile din Ag marcat liber. De aceea, sînt aplicate mai mult în RIA pentru steroizi sau peptide foarte mici. Tehnica este rapidă şi ieftină dar nu este larg aplicată. Substanţele folosite pentru separare sînt sulfatul de sodiu [55], sulfatul de amoniu [56], dioxanul [57], unii polimeri solubili în apă ca polietilenglicolul (Carbowax) [58, 59], sau alcool cu NaCl [60] sau alcool-acetat de amoniu [61].

B. **Tehnici imunochimice. Tehnica de separare cu dublu anticorp sau cu doi anticorpi** (fig. 3.2). Tehnica de separare cu dublu anticorp este cea mai larg utilizată, fiind universal aplicabilă. Iniţial, tehnica a fost imaginată pentru detectarea anticorpilor anti-insulină [62] şi apoi a fost extinsă la dozarea radioimunologică a hormonului de creştere [63] şi a insulinei [64]. Tehnica constă din precipitarea IgG din serul anti-hormon — primul anticorp — cu un al doilea anticorp adică cu un ser anti-IgG al speciei la care a fost preparat primul anticorp, urmînd separarea complexelor Ag—Ac prin centrifugare sau filtrare pe filtre milipor. Al doilea anticorp poate fi folosit ca ser imun total, ca IgG izolată din serul uman, ca IgG fixată pe primul anticorp (preprecipitare) sau pe suport solid: celuloză, agaroză [65].

Cînd al doilea anticorp este adăugat *după* atingerea echilibrului de reacţie al sistemului (postprecipitare) sistemul este îmbogăţit în gama-globuline de la specia la care a fost preparat primul anticorp în scopul realizării unor complexe precipitabile şi centrifugabile.

Una dintre condiţiile realizării unei separări adecvate este alegerea concentraţiei agentului de separare (al doilea anticorp) astfel încît să se obţină un exces optimal; concentraţii excesiv de mari pot duce la desfacerea complexelor Ag—Ac în exces de Ac (în cazul acesta Ag este IgG din I anticorp), iar concentraţii suboptimale fac să apară valori mici ale legării Ag marcat de I Ac. Concentraţia optimă a agentului imunochimic de separare se obţine lucrînd cu diluţii seriate ale celui de-al doilea anticorp în sistem antigen marcat-anticorp. Se alege cea mai mică

Scanned with OKEN Scanner

concentrație din II anticorp care dă legare maximă cu timp de incubare minim și variație minimă între replicate.

Un inconvenient al tehnicii cu dublu anticorp este prezența reacțiilor încrucișate între gamaglobulinele serului în care facem dozarea și serul anti-gamaglobulinele speciei la care s-a preparat I anticorp datorate similitudinii imunochimice a gamaglobulinelor celor două specii [66].

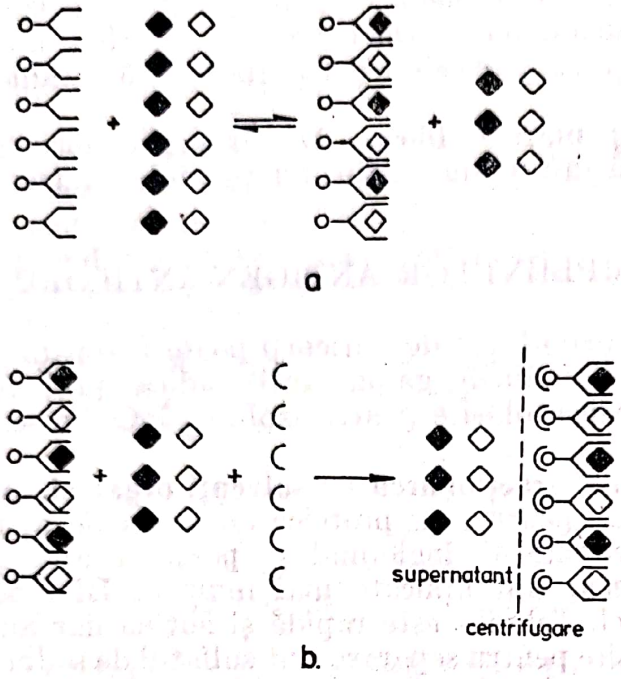


Fig. 3.2. — Reprezentare schematică a separării prin tehnica cu dublu anticorp. a) incubare; b) separare.

Un inconvenient mai rar întîlnit dar care este totuși de reținut, este similitudinea imunochimică dintre hormonul pe care îl dozăm și hormonul omolog din serul animalului la care am preparat al doilea anticorp. În acest caz avem două alternative: fie acceptăm o eroare uniformă prin însumare, fie recurgem la izolarea gamaglobulinelor din serul folosit ca al doilea anticorp, sau — în cazul steroizilor — se tratează serul precipitant cu un adsorbant (de exemplu cărbune).

Tehnica cu dublu anticorp este aplicată în mai multe *variante*. În varianta originală [63], al doilea anticorp este adăugat după faza de incubare a reactivilor specifici, urmînd o nouă fază de incubare pentru separarea antigenului liber rămas în supernatant de antigenul legat de anticorp care se separă în precipitatul sedimentat prin centrifugare. Incubarea cu al doilea anticorp se face la aceeași temperatură ca și preincubarea pentru a evita desfacerea complexelor antigen-anticorp prin schimbarea temperaturii.

Precipitarea primului anticorp cu anti-gamaglobulinele corespunzătoare [64] scurtează durata incubării: complexele antigen-anticorp sînt centrifugate sau sînt separate prin filtrare pe filtre milipor (tehnică laborioasă care necesită un nou rînd de eprubete pentru măsurare).

În ultimii ani au fost dezvoltate tehnici de separare folosind cuplarea celui de-al doilea anticorp pe fază solidă — celuloză, Sephadex sau

agarozã — în timpul incubării fiind necesară agitarea rotativă a eprubetelor urmată de centrifugare, spălarea fazei solide şi recentrifugare. Aceste tehnici sînt aplicate în special în laboratoarele care au instalaţii pentru automatizare; lucrate manual aceste tehnici consumă mult timp. Agitarea rotativă implică folosirea unor eprubete închise ermetic şi mulţi practicieni semnalează că radioactivitatea rămasă pe dopuri în timpul rotaţiei introduce un supliment de erori în dozare.

Pentru *calcul* se ţine seama că fracţiuni ale hormonului marcat lezat sau iodura radioactivă liberă nu apar în precipitatul specific dar în majoritatea cazurilor apare un procent de legare nespecifică a hormonului marcat în precipitat. Procentul real al legării nespecifice este detectat prin introducerea în fiecare serie de dozare a martorilor tampon, amestecul de reacţie conţinînd toţi reactivii cu excepţia primului anticorp şi a standardului sau necunoscutei. Volumul total de reacţie este menţinut uniform adăugînd în locul primului anticorp tampon şi în locul standardului plasmă fără substanţa de dozat. Procentul legării nespecifice variază între 1% şi maximum 10%; valori peste 10% perturbă sistemul şi arată că unii reactivi trebuie controlaţi.

3.4.3. SEPARAREA ÎN FAZĂ SOLIDĂ PRIN FIXAREA ANTICORPULUI (PRIMUL ANTICORP)

Termenul „dozare radioimunologică în fază solidă" a fost aplicat metodelor care folosesc forme insolubile de anticorpi pentru separarea hormonului (antigenul sau haptena) marcat liber de hormonul marcat legat [67]. Prima fază solidă aplicată în RIA a fost preprecipitarea serului de cobai anti-insulină cu ser anti-gamaglobuline cobai [64]. Ulterior, tehnica în fază solidă s-a consolidat ca o clasă aparte de tehnici de separare prin ataşarea anticorpului specific pe polimeri de polistiren [67 — 69] sau de dextran [70]. Tehnicile în fază solidă au o largă aplicare în chimie şi în imunologie datorită uşurinţei cu care produsul făcut insolubil poate fi izolat rapid din mediul de reacţie prin simpla spălare a substanţelor care au rămas în afara reacţiei.

În cazul radioimunodozării în fază solidă, anticorpul este făcut insolubil prin legarea sa de un polimer şi astfel este simplificată separarea Ag marcat legat de cel liber, deoarece trasorul legat de anticorp rămîne legat de faza solidă în timpul incubărilor (fig. 3.3). La terminarea reacţiei imunitare, trasorul liber este îndepărtat prin decantarea mediului de incubare şi spălarea rapidă a fazei solide în care se măsoară apoi radioactivitatea trasorului legat de anticorp.

Iniţial, pentru tehnica de separare în fază solidă, au fost folosiţi polimeri care au grupări izotiocianat reactive, capabile să formeze legături covalente cu grupările amino ale anticorpului. Aceste materiale sub formă de pulberi, erau distribuite în probe sub forma unor suspensii (ca şi cărbunele de exemplu) şi eprubetele trebuiau agitate în tot timpul incubărilor.

Ulterior, numărul şi varietatea materialelor utilizabile în tehnica separării în fază solidă au crescut considerabil iar tehnologia a fost mult simplificată.

Scanned with OKEN Scanner

A. **Pulberi conjugate covalent cu anticorpul.** Tehnica de conjugare pe polimeri de hidraţi de carbon ca dextran fin sau particule de celuloză prin activarea cu bromcian [67], imobilizează anticorpul ca şi o mare varietate de proteine şi peptide ca antigene, anticorpi, hormoni, enzime şi substraturile lor, steroizi sau tironine [71].

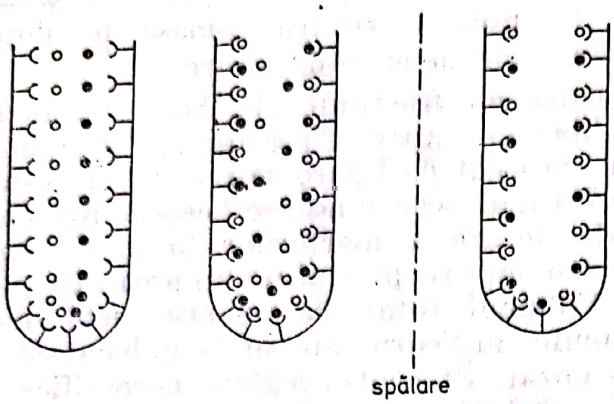


Fig. 3.3. — Reprezentarea schematică a tehnicii de separare în fază solidă pe eprubete din polistiren.

anticorp
antigen marcat
antigen nemarcat
FS fază solidă

Reacţia: $FS-Ac+Ag+{}^*Ag \rightarrow FS-Ac\begin{matrix}{}^*Ag\\Ag\end{matrix}+{}^*Ag$

Procedeul de cuplare constă din tratarea rapidă a polimerului cu bromcian la pH=10,5 şi apoi acesta este amestecat cu proteina aflată în soluţie la pH = 9. Grupările amino ale polimerului activat reacţionează pentru a forma legături covalente cu grupările amino ale proteinei sau ale altor compuşi. Polimerul activat poate fi conservat prin îngheţare pînă în momentul folosirii.

Materiale ca Sephadex G-25 ultrafin şi superfin sau microcristale de celuloză au fost folosite pentru conjugarea anticorpului şi conjugatele obţinute sînt larg utilizate în truse livrate comercial sau în laboratoare.

B. **Suprafeţe încărcate cu anticorp.** Anticorpul legat covalent pe discuri din material plastic prin procedeul cu bromcian a simplificat încă mai mult tehnica [51, 68, 72, 73, 74]. Ulterior s-a observat însă că nu mai este necesară activarea discurilor cu bromcian, deoarece pentru adsorbţia proteinelor pe suprafeţe din material plastic grupările reactive nu mai sînt necesare [72] (fig. 3.3). Tehnica de separare implică şi în acest caz agitarea continuă a eprubetelor care conţin discurile cu anticorp în tot timpul incubărilor.

Faza de separare a antigenului marcat de cel legat de anticorp a fost simplificată încă prin folosirea eprubetelor din material plastic pe care a fost adsorbit anticorpul [72]. Eprubetele de plastic sînt încărcate distribuind volume egale de antiser cu diluţii de 1 : 1 000—1 : 50 000 în tampon carbonat-bicarbonat de sodiu pH = 9,6 şi după o incubare de cîteva ore la temperatura camerei se clătesc cu un tampon salin proteinat [72]. Tehnica este folosită pentru dozarea a numeroşi hormoni proteici, peptidici sau steroizi.

În ceea ce priveşte condiţiile de legare a anticorpului pe eprubetele de plastic există unele variaţii generate atît de calitatea antiserurilor cît

Scanned with OKEN Scanner

şi de diferenţele de compoziţie ale materialelor plastice. Concentraţia adecvată a antiserurilor este determinată printr-o testare iniţială la diluţia 1 : 1 000.

Cînd captarea maximă a trasorului are loc cu antiseruri mai diluate, se pare că adsorbţia pe suprafeţele de plastic este favorizată de condiţii care diminuează asocierile intermoleculare şi interacţiunile hidrofile. De aceea pH-ul şi forţa ionică a soluţiei folosită pentru diluarea anticorpului sînt factori importanţi pentru procesul de încărcare. Rezultate bune au fost obţinute cu soluţii tampon cu pH alcalin şi forţă ionică redusă, de exemplu tampon carbonat-bicarbonat 0,05 M, pH = 9,6 sau tampon Tris 0,01 M, pH = 7,8. La pH = 9,6 gamaglobulina se adsoarbe rapid pe suprafaţa eprubetei atingînd nivel maxim în aproximativ o oră cu antiseruri diluate 1 : 1 000.

Pentru încărcare sînt folosite eprubete din diferite materiale ca polistiren, polietilenă, polipropilenă sau nylon.

Activitatea substanţei marcate adăugată unei probe este de aproximativ 50 000 — 100 000 imp/min pentru antigenele marcate cu ^{125}I la o activitate specifică de 100—200 μ Ci/μg. Ca şi în alte sisteme RIA, sensibilitatea metodei creşte cu reducerea masei substanţei marcate, dar această relaţie este mai puţin evidentă faţă de tehnicile în fază lichidă [51].

În condiţiile arătate mai sus, multe seruri anti-hormoni proteici dau o legare iniţială (B_0/T %) de 25—40%, legarea scăzînd pe măsură ce se adaugă hormon nemarcat. Serurile anti-peptide sau anti-steroizi, în special cînd sînt testate în mediu fără ser, dau legarea B_0/T de 50%, iar sistemul solicită activităţi mai mici ale trasorului introdus în sistem.

Legarea nespecifică a hormonului marcat pe suprafaţa eprubetelor este de obicei neglijabilă, iar excesul de hormon nemarcat reduce raportul B/T % la 1% şi tendinţa peptidei marcate de a se adsorbi pe plastic este diminuată de prezenţa proteinelor serice în sistemul de dozare. Remarcăm totuşi că hormoni sau substanţe hormonoide ca hormonul de creştere sau tiroglobulina care au o structură globulinică sînt adsorbite pe eprubete de polistiren. De aceea distribuţia acestor substanţe marcate în volume care depăşesc uşor limita superioară a încărcării cu anticorp, pot duce la adsorbţia lor nespecifică pe suprafeţe mici, ceea ce poate introduce unele variaţii în dozare. Acest inconvenient a fost folosit în scopul titrării anticorpilor anti-tiroglobulină [75] şi antihormon de creştere uman.

Sensibilitatea dozării în eprubete încărcate cu anticorp poate fi sporită distribuind trasorul la un interval de cîteva ore după preparatul de referinţă şi probele necunoscute, ca şi în alte dozări radioimunologice. Combinarea antigenului (hormonului) cu anticorpul ataşat pe faza solidă este ireversibilă şi rata disocierii din complexul Ag—Ac este efectiv zero [51]. Acest fenomen ar reflecta o interacţiune secundară între Ag şi Ac pe suprafaţa eprubetei; ea determină atingerea rapidă a echilibrului într-un sistem care aparent pare improbabil să favorizeze o asociere rapidă. Această legare ireversibilă a antigenului conferă unele avantaje unice sistemelor de dozare în fază solidă, deoarece probele pot fi preincubate cu anticorpul încărcat pe eprubete, apoi sînt aspirate complet şi înlocuite cu substanţa marcată, manevră care evită lezarea trasorului în timpul incubării cu lichidele biologice şi permite un spor de sensibilitate. În general, sistemele de dozare cele mai precise se obţin adăugîndu-se toate

Scanned with OKEN Scanner

componentele sistemului la începutul dozării, urmînd incubarea timp de 1—2 zile [51].

Temperatura de incubare a sistemelor de dozare în fază solidă variază cu *antigenul*. Deşi temperaturile joase sînt preferabile teoretic întrucît afinitatea anticorpului este maximă, iar alterarea trasorului este diminuată, totuşi, s-a observat că sistemele de dozare a hormonilor proteici dau rezultate superioare la temperatura camerei sau la 37°C. În acest caz se verifică alterarea trasorului prin cromatoelectroforeză sau adsorbţie

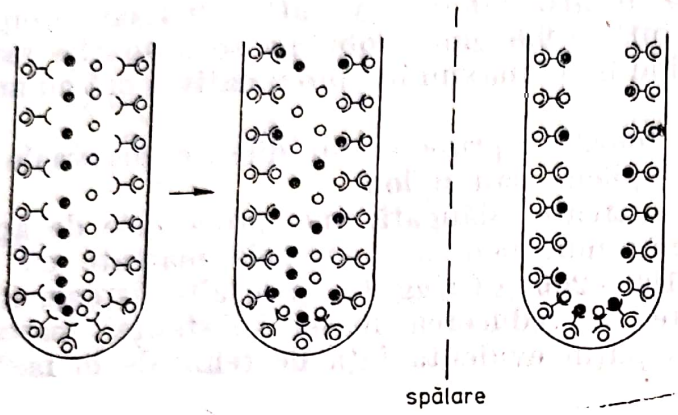


Fig. 3.4. — Reprezentarea schematică a tehnicii de separare în fază solidă, varianta „sandviş".

o antigen nemarcat
• antigen marcat
anticorpi
FS faza solidă

Reacţia: FS — Ag — Ac + Ag + *Ag → FS — Ag — Ac — Ag — *Ag + *Ag

pe cărbune. Anticorpul încărcat pe eprubetă nu leagă fracţiunea alterată a substanţei marcate şi aceasta este îndepărtată odată cu trasorul liber în fazele de spălare. Analiza cromatoelectroforetică a hormonului marcat liber arată alterări minore în timpul incubărilor. Temperatura joasă (+4°C) este esenţială pentru a obţine sensibilitate maximă în dozarea unor steroizi ca estradiolul.

Dozarea radioimunologică în fază solidă folosind eprubete încărcate cu anticorp este folosită şi pentru cantificarea substanţelor hormonoide (tiroglobulina) sau nehormonale (fibrinogenul, imunoglobulinele).

Pentru dozarea imunoglobulinelor a fost dezvoltată tehnica de dozare în „sandviş" (fig. 3.4) care constă din preîncărcarea eprubetelor cu antigen înainte de încărcarea cu anticorp [76, 77]. Acest sistem este mai sensibil decît cel prin încărcare numai cu anticorp. Sensibilitatea sporită în cazul dozării imunoglobulinelor este atribuită adsorbţiei *selective* pe eprubete a anticorpilor cu afinitate mare dar, probabil, şi accesibilităţii crescute a locurilor de legare ale antigenului pe aceste straturi de anticorp [78].

C. **Anticorp polimerizat.** Anticorpul poate fi insolubilizat şi prin polimerizarea antiserurilor cu agenţi care dau legături încrucişate (cross linking) ca cloroformiatul de etil sau glutaraldehida. Antiserul astfel polimerizat este spălat intensiv şi se determină titrul optim pentru dozare cu ajutorul antigenului marcat. Incubarea sistemului de dozare durează 1—

24 ore la 37°C, iar precizia maximă se obţine cu incubarea peste noapte. Metoda a fost aplicată iniţial pentru dozarea gonadotrofinelor [79] şi extinsă apoi la alţi hormoni ca estradiolul şi estrona cu incubare la temperatura camerei.

D. **Complexarea anticorpului pe particule feromagnetice.** O tehnică dezvoltată recent [80], care constă din legarea covalentă a anticorpilor pe particule feromagnetice, agitare şi separare cu ajutorul unui electromagnet, pare să fie adecvată atît pentru dozarea manuală cît mai ales pentru instalaţii de automatizare. Tehnica permite dozarea şi în condiţii de echilibru şi înainte de atingerea echilibrului de reacţie.

3.4.4. TEHNICI BAZATE PE MIGRAREA DIFERENŢIATĂ A Ag LIBER ŞI A COMPLEXELOR Ag—Ac

Tehnica prin cromatoelectroforeză a fost introdusă de Yalow şi Berson (1960) [81] pentru dozarea radioimunologică a insulinei şi a fost aplicată pentru separarea antigenului marcat liber şi a complexelor antigen-anticorp în numeroase sisteme de radioimunoanaliză a hormonilor peptidici. Separarea se face în tancuri de electroforeză deschise, pe benzi de hîrtie de cromatografie Whatman 3 MC (3MM), Toyo 514 sau DEAE celuloză, în tampon veronal 0,02 M, pH = 8,6, timp de 2—3 ore. Antigenul marcat liber este adsorbit pe hîrtie la locul de aplicare şi rămîne la origine, iar antigenul marcat legat de anticorp este purtat către centrul benzii de către fluxul de tampon produs prin evaporarea de pe bandă în timpul trecerii curentului. Separarea proteinelor serice nu are loc în cursul migrării ca în electroforeza convenţională, ci migrează în masă departe de origine. După uscare, radioactivitatea benzilor intacte este măsurată la un radiocromatograf sau se secţionează banda în două într-o zonă determinată prin vizualizare cu albastru de bromfenol, iar radioactivitatea fiecărei porţiuni este măsurată la un spectrometru gamma. Cantificarea hormonului se face prin calculul raportului celor două picuri (maxime) obţinute prin măsurarea radioactivităţii.

Tehnica de separare prin cromatoelectroforeză permite supravegherea calităţii antigenului marcat. Pe imaginea cromatoelectroforetică (fig. 3.5) obţinută cu un sistem de radioimunoanaliză, un antigen marcat bun prezintă un vîrf (pic) *simetric* în origine. În sistemele cu antigen marcat alterat apar componente care se deplasează de la origine, produse ale acţiunii nocive a iodurării precum şi procente variabile de iodură liberă cu migrare rapidă. Fracţiunile alterate în timpul iodurării şi/sau al incubărilor au viteză de migrare similară cu a antigenului legat la anticorp şi diferenţierea se face cu ajutorul probelor de control în absenţa anticorpului; procentul de antigen marcat alterat este apoi scăzut din procentul legării trasorului.

Nu totdeauna peptida marcată liberă este adsorbită la start; sînt substanţe ca gastrina, care migrează în sistemul cromatoelectroforetic cu prealbumina [54] (fig 3.5).

Electroforeza, cromatografia ascendentă şi filtrarea în gel nu prezintă avantaje speciale, sînt laborioase şi consumă volume relativ mari de reactivi, de aceea nu sînt utilizate decît sporadic.

Scanned with OKEN Scanner

Concluzii

Nici un sistem de separare nu s-a dovedit cu deosebire avantajos faţă de celelalte [82]. Sînt luate în considerare calităţile necesare pentru anumite sisteme de dozare, pentru procedeele disponibile sau selecţionate în scopul optimizării acestor sisteme şi pentru procedeele de control al

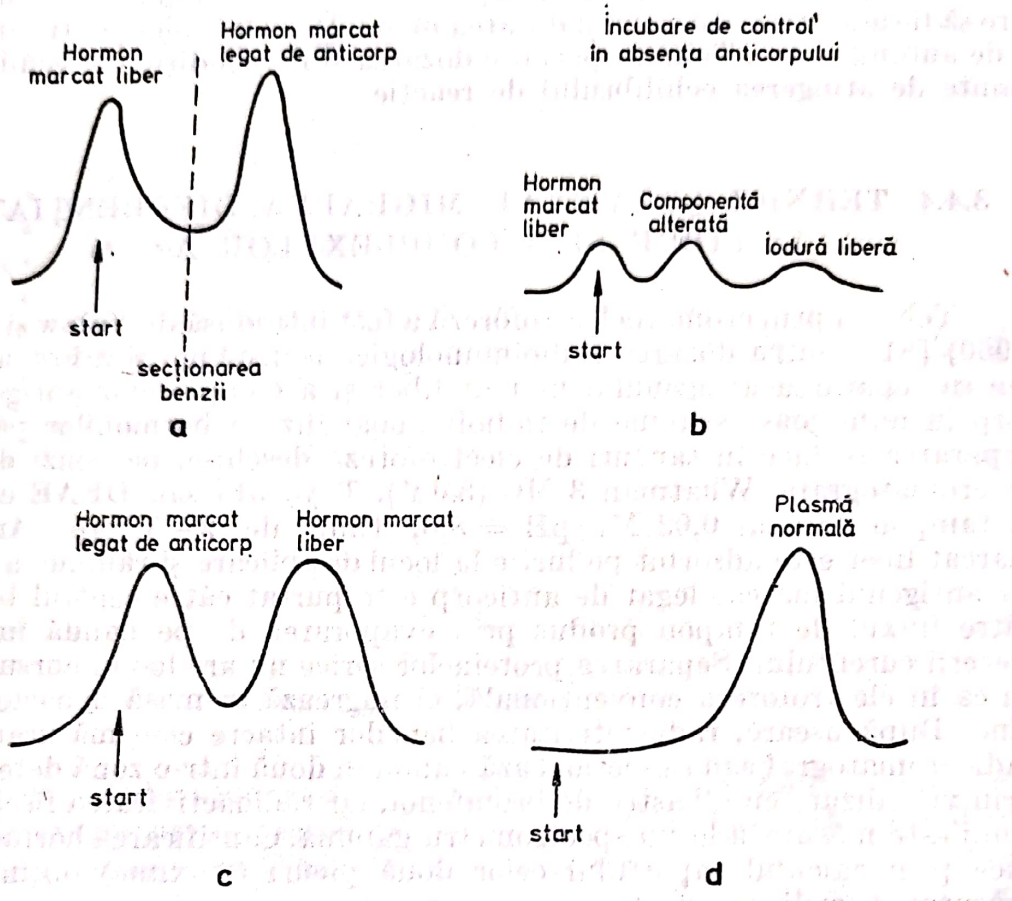


Fig. 3.5 (a, b, c, d). — Separarea cromatoelectroforetică a hormonului marcat liber de hormonul legat la anticorp:
a) cromatoelectroforeza tipică a amestecului de reacţie pentru legarea în punctul zero (B_0) al curbei standard pentru hormonii polipeptidici care sînt adsorbiţi la start; *b*) incubare de control pentru detectarea alterării substanţei marcate; *c*) imaginea cromatoelectroforetică a amestecului de incubare B_0 pentru hormonii care nu sînt adsorbiţi la start şi migrează cu proteinele serice ca în (*d*).

îndeplinirii condiţiilor. De aceea, la selecţionarea unei anumite metode de separare pentru un anumit sistem sau pentru un grup de sisteme de dozare sînt analizaţi următorii factori [82]:

— separarea completă a fracţiunilor liberă şi legată,
— reproductibilitatea separării complete,
— volumul de incubare necesar,
— efectul sistemului de separare şi al temperaturii necesară pentru separare asupra echilibrului reacţiei antigen-anticorp,
— efectul variaţiilor concentraţiei proteice asupra separării,
— efectul variaţiilor concentraţiei lichidelor biologice asupra integrităţii antigenului marcat,

Scanned with OKEN Scanner

— volumul de lucru necesar pentru optimizarea sistemului,

— costul materialelor, al aparaturii şi al lucrului necesar în aplicarea în condiţii de rutină,

— măsura în care o tehnică optimizată pentru un anumit sistem de radioimunoanaliză poate fi extins la un altul.

La adoptarea unei tehnici de separare se recomandă [82] să se ţină seama de unele aspecte :

— întrucît este de aşteptat să existe variaţii de la lot la lot chiar cînd sorbenţii sau serurile precipitante (al doilea anticorp) provin de la aceeaşi sursă, este necesar să ne asigurăm de cantităţi suficiente din aceeaşi tranşă pentru o lungă perioadă de timp ;

— pentru testarea artefactelor de separare nespecifică cu plasmă sau ser fără antigen sînt necesare unele precauţii. Sistemele de separare dacă sînt influenţate de plasmă sau ser peste diluţia uzuală, în incubate se va efectua egalizarea concentraţiei de ser sau de plasmă adăugînd cantităţi adecvate de ser sau plasmă. În acest caz, sistemul este testat dacă se comportă identic controlînd un număr mare de probe de plasmă sau ser fără antigen ;

— sistemele de separare care elimină antigenul liber sînt capabile să determine disocieri ale complexelor antigen-anticorp, în special cînd reacţia dintre antigen şi anticorp devine cu uşurinţă reversibilă ca în cazul multor sisteme cu antigene mici sau cu haptene. Gradul de reversibilitate al reacţiei trebuie apreciat pentru fiecare sistem de dozare ;

— tehnicile de separare cu anticorpi cuplaţi pe fază solidă sînt adecvate pentru automatizare deşi, uneori, au tendinţa să limiteze sensibilitatea şi precizia sistemului de dozare ;

— deşi nici o tehnică de separare nu îndeplineşte condiţiile unei tehnici de referinţă cu aplicaţii generale, totuşi o bună aproximaţie oferă tehnica cu dublu anticorp cu condiţia ca antiserul precipitant să fie bine selecţionat şi folosit în condiţii corect optimizate.

BIBLIOGRAFIE

1. N.K. Jerne, E.C. Wood, *Biometrics*, **5**, 273 (1949).
2. N.K. Jerne, W.L.M. Perry, *Bull. W.H.O.*, **14**, 167 (1956).
3. D.R. Bangham, B. Grab, *Bull. W.H.O.*, **31**, 111 (1964).
4. D.R. Bangham, P.M. Cotes, în "Radioimmunoassays methods", editat de K.E. Kirkham şi W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971, p. 345.
5. D.R. Bangham, P.M. Cotes, *Brit. med. Bull.*, **30**, 12 (1974).
6. S.A. Berson, R.S. Yalow, *Clin. Chim. Acta*, **22**, 51 (1968).
7. S.A. Berson, R.S. Yalow, în "Proceedings 9th Japan Conference on Radioisotopes", Tokyo, 1969, p. 643.
8. P.M. Cotes, în "In vitro procedures with radioisotopes in medicine", IAEA Symp., Vienna, 1970, p. 675.
9. P.M. Cotes, în "IAEA Panel on standardization procedures", Vienna, 1972.
10. P.M. Cotes, în "Radioimmunoassay and related procedures in medicine", IAES, Vienna, 1974, p. 71.
11. R.P. Ekins, *Brit. Med. Bull.*, **30**, 3 (1974).
12. A.R. Midgley, *Acta endocrinol.*, **142** (Suppl.), 163 (1969).
13. W.D. Odell, A.C. Charters, W.D. Davidson, J.C. Thomson, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **28**, 1840 (1968).
14. W.D. Odell, L.E. Rekhot, R.W. Bates, P. Halls, în "Protein and Polypeptide Hormones", editat de M. Margoulies, Excerpta Medica Found., Amsterdam, 1969, p. 124.
15. A.S. Outschoorn, în "IAEA Panel on Standardization Procedures", Viena, 1972.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

STANDARDIZAREA, OPTIMIZAREA, VALIDAREA ȘI CONTROLUL CALITĂȚII SISTEMELOR DE RADIOIMUNOANALIZĂ ȘI A CELOR SIMILARE

4.1. ASPECTE GENERALE

Parcursul realizării unui sistem de radioimunoanaliză este alcătuit din o serie de etape (tabela 4.1), egal de importante numai pentru creatorii acestor sisteme. Marea majoritate a beneficiarilor de sisteme RIA și a celor înrudite recurg fie la truse comerciale, fie la truse din prefabricate cum sînt cele oferite de OMS prin "National Institute for Biological Standards and Control" din Marea Britanie [1] sau de NIH "Pituitary Distribution Program" din S.U.A.

TABELA 4.1

Etapele realizării unui sistem de radioimunoanaliză

I. *Etape preliminare*

1. Producția antiserului
   - prepararea imunogenului
   - alegerea speciei de animal și a schemei de imunizare
   - caracterizarea și standardizarea antiserului
2. Prepararea antigenului marcat
   - alegerea izotopului
   - selecționarea metodei de marcare
   - purificare
   - caracterizare
   - conservare
3. Prepararea standardului
   - foarte purificat, parțial purificat, nepurificat
   - caracterizarea standardului
4. Selecționarea unei metode de separare a antigenului liber de cel legat la anticorp
5. Stabilirea volumelor de incubare
6. Alegerea sistemului tampon
7. Stabilirea timpului și a temperaturilor de incubare
8. Optimizarea sistemului de dozare
9. Validarea de laborator, statistică și clinică a sistemului

II. *Tehnica propriu-zisă*

1. Diluarea reactivilor
2. Distribuirea reactivilor în volume și concentrații prestabilite
3. Incubarea
   - timp
   - temperatură
4. Separarea fracțiunii legate de cea liberă
5. Măsurarea radioactivității (libere, legată sau ambele)
6. Exprimarea rezultatelor: curbă standard, calcul programat
7. Controlul calității

Scanned with OKEN Scanner

Componentele esenţiale ale unui sistem RIA — antiserul, hormonul marcat, standardul şi tehnica de separare — au fost prezentate în capitolele 1, 2 şi 3, de aceea vom reveni asupra lor numai în măsura în care sînt necesare referiri la aspecte legate de standardizarea, optimizarea şi validarea metodei în ansamblul ei, ca produs final.

În paginile în care am prezentat preparatul de referinţă sau standardul (vezi 3.1) noţiunea de standardizare a fost aplicată în sens strict, şi anume, comparaţia calitativă şi cantitativă cu un „etalon". Analizînd însă modul de tratare a aspectelor legate de standardizare în cadrul metodologiei RIA şi a sistemelor înrudite, observăm că, aplicată la metodă ca un întreg, noţiunea de standardizare este adoptată în sens larg, ca respectare a unui ansamblu de reguli sau canoane care să asigure, în ultimă instanţă, fiabilitatea sistemelor de dozare [1—10].

Fiabilitatea este un termen global, echivalent cu calitatea şi reprezintă rezultanta procesului de optimizare şi a celui de validare.

Procesul de *optimizare* a sistemului de dozare implică o suită de măsuri care privesc componentele sistemului cu consecinţe asupra ansamblului metodei; Aceste măsuri vizează asigurarea condiţiilor de *sensibilitate* şi de *precizie* adecvate scopului propus.

Procesul de *validare* a sistemelor de radioimunoanaliză implică trei aspecte principale: validarea de *laborator* cere asigurarea *identităţii* (sau cel puţin a similitudinii) de comportare imunochimică în cadrul sistemului a substanţei necunoscute cu preparatul standard; validarea *statistică* implică respectarea unor criterii ca precizia, sensibilitatea, specificitatea, exactitatea şi care pot fi estimate prin tehnici (procedee) statistice; validarea *clinică* sau eficienţa unui sistem de analiză este asigurată numai cînd se poate demonstra că substanţa care se dozează are *semnificaţie* fiziologică şi/sau patologică.

Normele generale de standardizare, optimizare şi validare a sistemelor cu radioliganzi nu diferă de cele stabilite cu cîteva decenii în urmă pentru metodele de dozare chimice şi biologice. De aceea, în cele ce urmează ne vom ocupa în special de aspectele legate strict de sistemele de analiză care folosesc radioliganzi.

4.2. STANDARDIZAREA

Recomandările de standardizare [1, 2, 4] se referă la lucrul în laborator şi sînt aplicate reactivilor, probelor necunoscute, condiţiilor de incubare (volum, timp, temperatură), tehnicii de separare, de măsurare a radioactivităţii, de cantificare, modului de exprimare a rezultatelor etc. O altă serie de recomandări au ca adresă etape care se desfăşoară şi în afara laboratorului, de exemplu stabilirea normalităţii, selecţionarea şi pregătirea bolnavului, prelevarea şi codificarea probelor biologice, interpretarea rezultatelor (tabela 4.2). Aceste recomandări implică legături funcţionale permanente între laborator şi departamentele clinice sau experimentale.

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 4.2

Standardizarea în dozarea hormonilor prin metode RIA şi înrudite

Faza de lucru	Criteriul de standardizare	Recomandări
1. Prelucrarea probelor biologice	Reducerea variaţiilor de prelucrare	Condiţii uniforme de separare a serului, plasmei Tehnici uniforme de extracţie aplicate serului, plasmei, urinii, LCR, ţesuturilor
2. Conservarea probelor biologice	Evitarea pierderii activităţii hormonale	Congelare sub punctul eutectic
3. Metoda de dozare	Asigurarea specificităţii şi sensibilităţii Reducerea variabilităţii intra- şi interserii	Aplicarea criteriilor de standardizare fiecărui reactiv, tehnicii de separare, de măsurare, de calcul, metodei în ansamblu
4. Exprimarea rezultatelor	Favorizarea comparabilităţii rezultatelor	Pentru hormonii polipeptidici conform recomandărilor (WHO Technical Report Series 565/1975) Pentru hormonii steroizi în sistemul internaţional de unităţi (unităţi SI)
5. Interpretarea rezultatelor	Evitarea rezultatelor greşite	Evaluarea, tuturor parametrilor care pot influenţa rezultatul, ex.: vîrstă, sex, stare fiziologică şi psihologică, ritmuri biologice, alimentaţie, medicamente etc. Compararea cu valorile normale stabilite pentru populaţia căreia îi aparţine pacientul

4.2.1. REACTIVII — CONSIDERAŢI INDIVIDUAL

Antigenele şi haptenele. Sînt folosite în RIA şi în sistemele de analiză înrudite ca reactivi marcaţi legaţi, în cursul dozării, de o proteină de legare. Spre deosebire de sistemele RIA, în care esenţială este conservarea configuraţiei antigenice, în alte sisteme de dozare ca cel prin legare la o proteină receptoare, este necesară şi integritatea activităţii biologice a moleculei. În general, antigenul şi orice altă substanţă adecvată pentru marcare trebuie să fie cît mai pură, şi de preferat omologă şi identică cu substanţa pe care vrem să o măsurăm. Sînt totuşi numeroase situaţii în care sînt folosite antigene eterologe, de exemplu insulina porcină pentru sistemul de dozare a insulinei la om, sau subunităţi ale unei substanţe hormonale cum sînt subunităţile β ale LH pentru dozarea LH sau materiale de sinteză ca secvenţa β—1,24 a ACTH pentru dozarea ACTH etc.

Scanned with OKEN Scanner

Contaminanţii care pot interfera cu substanţa de dozat în cursul analizei trebuie îndepărtaţi prin procedeele uzuale. În cazul hormonilor polipeptidici aceştia sînt întîlniţi frecvent fie sub formă de precursori ai hormonilor ca proinsulina, ca produşi înrudiţi sau de degradare (peptida C a insulinei, insulina desamidată), fie înrudiţi structural ca subunităţile hormonilor glicoproteici (LH, FSH, TSH, HCG) sau neînrudiţi ca proteinele serice în cazul HGH. O varietate de probe servesc pentru verificarea purităţii: greutatea moleculară, încărcarea de suprafaţă, aminoacizii care alcătuiesc lanţul amino- şi carboxiterminal, compoziţia în aminoacizi şi în hidraţi de carbon sau reacţia cu antiseruri specifice care pot distinge hormonul intact de contaminanţi structural similari cum sînt subunităţile alfa în preparatele de hormoni glicoproteici.

După marcare, chiar atunci cînd substanţele au molecule structural strîns înrudite ca familia hormonilor glicoproteici hipofizari, trasorul trebuie să fie adus într-o formă cît mai omogenă. Cînd trasorul rămîne totuşi contaminat, important este ca diferitele molecule care îl poluează să nu fie recunoscute în sistemul de dozare nici în cursul reacţiei cu anticorpul sau cu proteina de legare dar nici de agenţii folosiţi pentru separarea hormonului marcat legat de cel liber.

Sistemele de dozare care determină activitatea biologică a unei substanţe cer ca trasorul să-şi conserve activitatea biologică atestată prin compararea cu un preparat bine caracterizat. Această etapă nu este necesară în cazul substanţelor care nu pun probleme asupra identităţii dintre trasor şi substanţa de dozat ca în cazul steroizilor uşor de caracterizat prin metode fizicochimice.

Au fost dezvoltate sisteme de dozare care nu folosesc substanţe marcate cu izotopi radioactivi, ci cu alte tipuri de trasori ca enzime, bacteriofagi sau o substanţă fluorescentă. Măsurile de asigurare a eficienţei acestor trasori în sistemele de dozare sînt aceleaşi ca şi în cazul trasorilor radioactivi.

Datele esenţiale asupra trasorului produs în laborator sau livrat comercial sînt stabilite de OMS [1]. Aceste date cuprind: cantitatea aproximativă de hormon (în unităţi de masă) şi radioactivitatea specifică (de exemplu mCi/mg sau μCi/μg etc.), izotopul radioactiv folosit şi eventual poziţia de marcare în moleculă şi numărul mediu de atomi radioactivi per moleculă, procentul legării radioactivităţii în exces de reactiv de legare, condiţiile de conservare şi dacă sînt indicaţii de repurificare înainte de folosire în sistemul de dozare.

Antiserul şi alte substanţe de legare. Două categorii mari de preparate imunogene (vezi § 2.3) servesc pentru producerea antiserurilor folosite în RIA: antigene (hormoni) peptidici cu molecule mari şi haptene (hormoni cu molecule mici). Este de preferat ca animalele să fie inoculate cu preparate foarte purificate de hormoni peptidici astfel încît să fie evitată poluarea antiserului cu anticorpi ai contaminanţilor, dar atunci cînd o astfel de purificare nu este economică, antiserurile sînt ulterior supuse procedeelor de absorbţie sau de cromatografie de afinitate. Puritatea antiserurilor este uneori de o importanţă deosebită ca în cazul testelor de sarcină efectuate prin metode imunochimice. Pentru hormonii peptidici care au înrudiri structurale cu hormonii altor specii, pot fi folosite şi imunogene eterologe (nu numai omologe) ca în cazul hormonului paratiroidian şi a TSH bovin utile în sistemul de dozare la om.

Scanned with OKEN Scanner

La prepararea antiserurilor pentru molecule mici ca hormonii steroizi sau cei tiroidieni (T_3 şi T_4) puritatea iniţială a imunogenului este absolut necesară. Imunogenele folosite în acest scop sînt în majoritate conjugate ale moleculei mici cu o proteină, procedeele de conjugare permiţînd realizarea unei specificităţi oarecum dirijate. Locul de conjugare este astfel ales încît să nu interfereze cu acele porţiuni ale moleculei care îi conferă activitatea caracteristică şi eventual să mascheze acele porţiuni ale moleculei comune cu ale altor hormoni din aceeaşi familie favorizînd astfel reacţii încrucişate cu aceştia. Un exemplu este serul anti-progesteronă conjugată cu proteina purtătoare în poziţia C-6 care recunoaşte în egală măsură şi 5 α-pregnan-3,20-dionă, pe cînd antiserul obţinut cu progesteronă conjugată în C-11 reacţionează încrucişat numai 3 % cu steroidul înrudit.

În general, dacă un antiser este eficient pentru sistemele de radioimunoanaliză, natura imunogenului nu mai este relevantă.

Descrierea antiserului trebuie să conţină informaţii referitoare la substanţa (hormonul) pentru care poate fi folosit în dozare, diluţia iniţială sau finală şi volumul adăugat sistemului, constanta de echilibru (K) în anumite condiţii specificate. Antiserurile cu valoarea lui K mai mare sau egală cu 10^{10} l/mol sînt adecvate pentru estimarea unor cantităţi mici, de ordinul picomolilor de hormon în lichidele biologice, pe cînd cele cu valori ale lui K de ordinul a 10^8 — 10^9 l/mol sînt utile pentru măsurarea unor substanţe prezente în concentraţii mari, de exemplu HPL. Alte date utile privesc gradul de reactivitate încrucişată cu substanţe contaminante sau cu hormoni prezenţi în lichidele biologice, exprimat sub forma coeficientului de eterogenitate (vezi § 2.3.5), imunogenul folosit şi specia de animale care a fost inoculată pentru a obţine antiserul.

În unele metode, înrudite cu radioimunoanaliza, trasorul radioactiv nu este antigenul, ci anticorpul.

Anticorpii marcaţi sînt folosiţi în sistemele de analiză imunoradiometrice cu unul sau cu două situsuri. Prepararea trasorului în acest caz implică unele subtilităţi tehnice generate de exigenţele de puritate. Marcarea anticorpilor are loc fie după complexarea cu antigenul, fie după disocierea lor din complexele antigen-anticorp. Puritatea anticorpului marcat este deci dependentă de puritatea antigenului folosit pentru complexare. Anticorpul marcat poate fi folosit sub formă solubilă sau legat la un purtător insolubil.

Alte substanţe de legare. Reacţia antigen-anticorp poate fi înlocuită în unele sisteme de analiză a hormonilor prin alte procese de legare în care substanţa de legare nu este anticorpul ci unele proteine plasmatice cu funcţie de transport de exemplu pentru T_4, cortizol, testosteronă, sau progesteronă, unele preparate obţinute din organele receptoare ca receptorii renali pentru parathormon, cei gonadici pentru LH şi HCG, etc. Metodele de analiză cu proteine receptoare impun integritatea biologică a trasorului folosit în sistemul de analiză.

Criteriile pentru selecţionarea proteinelor de legare neimunitare sînt similare cu cele aplicate anticorpilor; constanta lor de echilibru însă are valori mai reduse decît a anticorpilor (10^8 — 10^9 l/mol) iar K pentru proteinele receptoare are valori comparabile cu ale anticorpilor (peste 10^{10} l/mol).

Substanţa de referinţă (vezi § 3.1.). Substanţele de referinţă au fost clasificate în două mari categorii [1]: substanţe de referinţă necesare pentru asigurarea specificităţii şi sensibilităţii unui nou sistem de dozare

Scanned with OKEN Scanner

şi substanţe utile pentru cantificarea rezultatelor, numite obişnuit standarde. Totuşi, denumirea de substanţă de referinţă poate preta la confuzii cu preparatele de referinţă sau cu standardul, de aceea pare preferabil să fie numite „substanţe de control" al specificităţii sistemului.

Condiţia esenţială pentru o substanţă de control este înrudirea cu substanţa de dozat astfel încît prin prezenţa sa în sistemul de dozare să putem detecta eventuale reacţii încrucişate în cazul imunodozărilor. De exemplu, la punerea la punct a unui sistem de dozare al LH sînt folosite ca substanţe de control preparate hormonale înrudite cu acest hormon, ca FSH, TSH şi HCG sau pentru verificarea sistemului de dozare a insulinei se foloseşte proinsulina, iar în cel de dozare a HCG se folosesc subunităţile beta ale HCG. De asemenea, la testarea specificităţii sistemului de dozare al unui anumit steroid, de exemplu al progesteronei, se foloseşte ca substanţă de control orice substanţă chimic înrudită cu progesterona, ca 17-hidroxiprogesterona, testosterona, corticosterona.

Substanţele de control pentru dozarea hormonilor steroizi sînt disponibile comercial, iar cele pentru dozarea multor hormoni polipeptidici sînt oferite gratuit de OMS [1].

Standardul folosit pentru cantificarea rezultatelor trebuie să fie pe cît posibil identic cu substanţa pe care o dozăm şi trebuie inclus în fiecare serie de dozare în lucrul de rutină. Criteriul de selecţie pentru un astfel de preparat este gradul de similitudine cu substanţa de măsurat şi standardul ideal este hormonul omolog dar adeseori sînt folosite şi preparate eterologe. Extinderea metodelor de analiză cu radioliganzi şi unele necesităţi de ordin economic au dus la diferenţierea standardelor în mai multe categorii.

Standardul de laborator este un preparat care a fost calibrat faţă de un standard naţional sau internaţional şi serveşte pentru calibrarea standardului de lucru folosit în seriile de rutină. Standardul „casei" este o porţie dintr-un lot mare de preparat standard, faţă de care sînt calibrate loturile noi pentru asigurarea continuităţii.

Odată stabilită eficienţa unui standard, problema cea mai importantă este cea a stabilităţii sale în timpul conservării.

Agenţii de separare a hormonului legat de cel liber. Metodica dozării hormonilor cu radioliganzi dispune de o mare diversitate de agenţi şi tehnici de separare a hormonului marcat legat de cel liber (vezi § 3.4). Tehnicile cu aplicabilitate largă sînt cele cu limite de toleranţă mari la variaţiile de temperatură, timp şi volum de incubare, pH sau la variabilitatea sursei substanţelor de dozat (ser, urină, LCR, ţesut). Tehnica de separare cu dublu anticorp pare să prezinte limitele de toleranţă cele mai largi, deşi unele inconveniente generate de neomogenitatea loturilor de anticorp precipitant, de prelungirea timpului de incubare şi de eventualitatea unor reacţii încrucişate cu proteine din lichidele biologice nu sînt de neglijat.

Alte substanţe şi instrumentar folosite în dozările cu radioliganzi. Materialele auxiliare includ substanţele chimice, lichidele de scintilaţie, instrumentele de pipetare, recipienţii pentru probe, eprubetele etc.

Potenţial, fiecare în parte poate perturba sistemul de dozare în cel puţin una din fazele de lucru, de aceea selecţionarea şi supravegherea lor solicită tot atîta grijă ca şi reactivii principali.

Stabilirea volumului de incubare. Volumul de incubare este stabilit în funcţie de tehnica selecţionată pentru a separa fracţiunile liberă şi

Scanned with OKEN Scanner

legată de anticorp. În tehnica cu dublu anticorp, volumul de incubare variază între 0,3 şi 1,0 ml, obişnuit 0,5 ml. În această tehnică, volumele mai mici sînt preferate pentru a diminua cantitatea de al doilea anticorp necesară obţinerii precipitatului şi astfel costul este mai redus. În tehnicile care folosesc pentru separare adsorbenţi ca talc, cărbune-dextran sau răşini, volumele de incubare sînt mult mai mari şi variază între 2 şi 3 ml. Costul adsorbentului este foarte redus, iar folosirea unor volume mari are unele avantaje :

— concentraţia antigenului marcat este redusă,

— scade fracţiunea din supernatant care este adsorbită pe eprubetă sau capturată în sediment,

— adsorbţia antigenului marcat pe sticla eprubetei scade, raportul suprafaţă de adsorbţie/volum scade prin creşterea volumului de incubare.

La determinarea radioactivităţii în probe cu volume mari, contorii nucleari cu cristal de scintilaţie de iodură de sodiu tip puţ standard permit măsurători pe probe cu volume pînă la 2—3 ml fără ca nivelul lichidului din probă să treacă de limita superioară a cristalului, eficienţa de numărare rămînînd în limite de variaţie acceptabile. Cînd volumul probelor este mai mare decît limita permisă de adîncimea puţului din cristal, eficienţa de numărare suferă variaţii necontrolabile.

Timpul şi temperatura de incubare. Din punctul de vedere al timpilor de incubare, distingem tehnici RIA într-un timp. În acest caz antigenul marcat şi nemarcat fiind incubate simultan cu antiserul corespunzător (reacţie competitivă), este necesar ca timpul de incubare să fie stabilit astfel încît reacţia antigen-anticorp să ajungă la echilibru. Totuşi, dacă în seria de dozare standardul şi necunoscutele sînt manevrate în mod identic, atunci realizarea echilibrului nu mai este necesară.

Timpul necesar pentru reacţia de asociere-disociere depinde atît de antigen cît şi de antiserul folosit în sistem şi de aceea trebuie evaluat pentru fiecare nou sistem de dozare.

La starea de echilibru a sistemului antigen-anticorp se ajunge mult mai rapid la 37°C decît la 4°C dar energia de reacţie este mai redusă la temperatură mai ridicată. De aceea, majoritatea sistemelor sensibile sînt incubate la 4°C cu timp de incubare de 2—6 zile pe cînd sistemele mai puţin sensibile pot fi incubate la 37°C cîteva ore, folosind acelaşi antiser [4].

Măsurarea radioactivităţii. Pentru sistemele de analiză care folosesc antigene marcate cu emiţători gamma, ^{125}I sau ^{131}I, instrumentul de elecţie pentru măsurarea radioactivităţii probelor este contorul cu cristal de scintilaţie de iodură de sodiu tip puţ, iar pentru sistemele cu antigen marcat cu emiţători beta, ^{3}H sau ^{14}C, este contorul cu lichid de scintilaţie pentru care obişnuit este necesar şi un sistem de răcire.

Opţiunea pentru instrumente manuale sau pentru cele cu schimbător automat de probe este influenţată de mulţi factori, printre care costul, eficienţa, posibilitatea depanării rapide etc. Instrumentele automate pot fi conectate la un teleprinter cu perforator de bandă care uşurează prelucrarea rezultatelor prin conectarea la un minicalculator.

Cînd s-a stabilit că eroarea de pipetare nu trece de 1%, nu mai este necesar să se măsoare radioactivitatea totală în toate probele; măsurarea fie a fracţiunii legate, fie a celei libere în funcţie de tehnica de separare folosită este suficientă.

Scanned with OKEN Scanner

Timpul de măsurare pentru o probă este selecţionat astfel încît să reducă eroarea de citire a radioactivităţii la 1—3 %.

În timpul procedeelor de marcare sînt necesare măsurători ale unor activităţi cu cîteva ordine de mărime mai mari decît în cursul tehnicilor de dozare. În acest scop, pentru emiţătorii gamma, sînt suficiente radiometre tip camere de ionizare, cunoscute sub numele de „calibratori de doze". În lipsa acestora pot fi folosiţi contorii cu cristal de scintilaţie tip puţ. În acest caz, fie reducem sensibilitatea lor montînd eprubeta de măsurat la o distanţă oarecare de cristalul de iodură de sodiu ajutîndu-ne de un dispozitiv care să permită condiţii de geometrie reproductibile, fie reducem volumul sau concentraţia radioactivităţii în proba de măsurat.

Calculul şi exprimarea rezultatelor. În sistemele de analiză radioimunologică sînt folosite o varietate de sisteme de coordonate pentru reprezentarea curbei doză-răspuns. Doza poate fi exprimată în scara aritmetică sau logaritmică. Variabila de răspuns poate fi exprimată ca valoare absolută în număr de impulsuri în fracţiunea legată (B) sau în cea liberă (F) sau ca valoare relativă sub forma unui raport : fracţiunea legată faţă de totalul radioactivităţii folosită în sistem (B/T sau B/T %), fracţiunea legată faţă de cea liberă (B/F) raportul invers (F/B), radioactivitatea legată în eprubetele incubate cu hormon rece (B_1) faţă de radioactivitatea în eprubeta fără hormon rece (B_0) numită şi martor ser (B_1/B_0) sau (B_1/B_0 %) sau un raport invers (B_0/B_1). Exprimarea variabilei de răspuns ca logit (B_1/B_0) are implicaţii în lărgirea posibilităţilor de calcul grafic şi programat. În calculul acestor rapoarte se ţine seama de valoarea „nespecifică" obţinută în absenţa anticorpului blancul sau martorul tampon sau în prezenţa dozei infinit (doza la care porţiunea terminală a curbei devine asimptotă). Aceste valori se scad din numărător sau din numitor după raportul folosit pentru variabila de răspuns. De exemplu, din numărătorul raportului B_1/B_0 se scade valoarea dozei infinit, iar din numitor se scade valoarea martorului tampon. Cînd parametrul nespecific nu este prea mare, de exemplu 1—5 % pentru martorul ser sau 5—10 % pentru doza infinit, excluderea lor prin calcul nu mai este strict necesară.

Indiferent de sistemul de coordonate selecţionat, calculul necunoscutelor se efectuează prin interpolare grafică sau prin calcul programat. Şi interpolarea grafică şi cea prin calcul pot folosi fie curba înscrisă în coordonate aritmetice care are în general o formă sigmoidală, fie curba liniarizată prin diferite transformări aritmetice, de exemplu reciproca numărului de impulsuri funcţie de doză, transformări logaritmice [13] ca aceea logit (B_1/B_0) funcţie de log (doza) larg utilizată sau transformarea probit şi arc-sin [13] de interes mai mult teoretic. Folosul liniarizării constă în extinderea limitelor de interpolare şi în zona dozelor mici şi a celor mari, sigmoida permiţînd interpolare corectă mai ales în zona dozelor medii.

Transformările matematice ale coordonatelor curbei nu permit totdeauna liniarizarea corectă, de aceea au fost propuse metode de netezire a curbei prin ponderare folosind funcţia spline [11]. Deşi tehnicile de liniarizare sînt utile şi pentru alte scopuri, de exemplu probele de paralelism necesare validării unei dozări, totuşi subrutine simple pot rezolva acest aspect şi în cazul curbelor obţinute prin calculul de netezire fără liniarizare [11, 12].

Scanned with OKEN Scanner

Folosirea calculatorului permite înscrierea curbei cu ajutorul metodelor statistice ca metoda celor mai mici pătrate, funcţia spline etc., calculatoarele cu capacitate mare putînd înscrie grafic curbele experimentale şi calculate.

Pentru exprimarea rezultatelor dozării încă nu s-a ajuns la o modalitate universală, de exemplu în termeni de masă sau de molaritate, în termeni de un anumit preparat de referinţă sau în termeni de unităţi arbitrare. Pentru substanţele bine caracterizate chimic sînt folosite în general unităţi de masă, de exemplu pentru hormonii steroizi, pentru digoxină etc. Deşi în sistemele de imunodozare se măsoară porţiunea imunoactivă, rezultatele dozării multor hormoni polipeptidici (HCG, insulină, HGH etc.) sînt exprimate în termeni de unităţi biologice deoarece standardul a fost bine caracterizat din punctul de vedere al activităţii biologice.

Exprimarea neuniformă a concentraţiei hormonilor uneori ca valoare în 1 ml, alteori în 100 ml sau per volum de incubare, pretează uneori la confuzii, ca în cazul testosteronei plasmatice.

Ţinînd seama că în unele sisteme de dozare cu radioliganzi cum sînt cele care folosesc receptori naturali se măsoară porţiunile bioactive ale hormonilor, se impune un mod de exprimare a rezultatelor explicit, de exemplu specificînd nu numai valoarea obţinută ci şi metoda de dozare : chimică, biologică, RIA, alte sisteme de legare precum şi standardul folosit dacă a fost identificat [1].

Automatizarea metodelor de dozare cu radioliganzi. Dezvoltarea unor sisteme automate pentru rezolvarea radioimunoanalizelor reprezintă o etapă aparte în evoluţia domeniului dozărilor cu radioliganzi. Deşi au fost posibile multe analogii cu sistemele multicanal folosite în chimia şi enzimologia clinică, totuşi unele particularităţi ca folosirea izotopilor radioactivi au solicitat cercetări speciale. Pentru sistemele de dozare în eprubetă au fost create aparate multicanal folosite curent pentru dozări hormonale în laboratoarele centrale regionale. Aceste aparate sînt încă foarte costisitoare şi necesitînd revizii periodice laboratorul trebuie dotat cu cel puţin două maşini de acest tip.

În curs de dezvoltare sînt sistemele liniare cu flux continuu cu sensibilitate mai redusă decît a sistemelor în eprubetă şi de aceea aplicabile dozării hormonilor cu concentraţii mari, de exemplu HCG şi HPL sau în procesul de preparare industrială a insulinei [4].

4.3. OPTIMIZAREA ŞI VALIDAREA SISTEMELOR RIA ŞI SIMILARE

Optimizarea sistemelor de analiză radioimunologică vizează obţinerea unor reactivi cît mai adecvaţi scopului propus, dezvoltarea unor tehnici de separare cît mai aproape de condiţia ideală a separării complete, realizarea unor condiţii de incubare, de măsurare a radioactivităţii şi de calcul care să asigure erori minime în estimarea rezultatelor. Aceasta înseamnă de exemplu antiseruri cu specificitate strictă, cu afinitate cît mai mare, trasor cu puritate şi stabilitate maxime, standard perfect identic cu sub-

Scanned with OKEN Scanner

stanţa de dozat, pipetare şi măsurare cu eroare minimă, interpolare corectă a rezultatelor etc.

Posibilităţile de realizare şi limitele actuale au fost prezentate în capitolele 2, 3 şi în § 4.1 şi 4.2.

4.3.1. VALIDAREA EXPERIMENTALĂ

Vizează asigurarea identităţii substanţei necunoscute cu substanţa standard. Sursele posibile ale neidentităţii lor imunochimice au fost expuse în § 3.1.1 — 3.1.5. Probele experimentale de verificare a identităţii standardului cu substanţa necunoscută sînt probe de comportare în cadrul sistemului de dozare. Deşi sînt numeroase situaţiile în care asemenea probe sînt indispensabile pentru asigurarea unui rezultat, totuşi nu dispunem decît de cîteva variante experimentale : proba paralelismului între curba standard şi curba de inhibiţie dată de substanţa necunoscută [5, 6, 14, 15], proba de recuperare prin adiţia necunoscutei la standard [14], proba condiţiilor de incubare variabile [16] şi proba variaţiei raportului anticorp-antigen marcat.

4.3.2. VALIDAREA STATISTICĂ

Înainte de a decide că un anumit sistem de analiză cu radioliganzi este adecvat pentru a fi lansat în practică, sistemul este analizat pe baza datelor experimentale folosind o serie de criterii statistice pentru validare.

— Liniarizarea curbei standard după transformări adecvate. Testul cel mai simplu pentru verificarea acestui criteriu este înscrierea grafică, punctele obţinute aproximînd o dreaptă. Există însă şi probe statistice obiective ca testul „t" sau un test chi-pătrat de liniaritate care arată dacă eroarea medie ponderată (intra-serie) este mai mică decît eroarea ponderată a împrăştierii mediilor în jurul dreptei [17]. Acest mod de tratare a datelor experimentale este deosebit de sever ţinînd seama că deşi eroarea intrinsecă este adesea atît de mică încît împrăştierea în jurul mediei este nesemnificativă, totuşi proba de liniarizare arată abateri semnificative [8]. Sînt autori [11, 12] care arată că liniarizarea nu este obligatorie şi că transformarea logit-log aplicată unor sisteme practic valide arată inflexiuni la capetele curbei. De aceea, opţiunea pentru acest test rămîne la aprecierea cercetătorului.

— Panta curbei standard trebuie să fie semnificativă, acesta fiind un criteriu care nu poate fi evitat, în sistemele de dozare cu radioliganzi eroarea fiind minimă. Pantele curbei standard şi ale curbelor de inhibiţie date de cantităţi seriate din necunoscute trebuie să nu devieze semnificativ adică să fie paralele după ce li s-a aplicat o metodă de liniarizare. Analiza grafică vizuală de suprapunere a dreptelor poate fi obiectivată prin aplicarea testului chi-pătrat al datelor experimentale transformate şi ponderate [17, 18].

— Specificitatea a fost definită ca o măsură a libertăţii de reacţie între reactivii care alcătuiesc un sistem de dozare [8], sau, mai clar, ea este capacitatea unei metode de a rămîne indiferentă la asaltul altor substanţe decît cea pe care dorim s-o măsurăm, prezente şi ele în sistemul de dozare.

Scanned with OKEN Scanner

Sistemele de dozare cu radioliganzi, ca orice sistem complex, sînt susceptibile de multiple interferenţe ale unor factori specifici, intrinseci sistemului sau ale unor factori nespecifici ocazionali.

Factorii specifici sistemului ca reactivitatea imunologică încrucişată implicînd calitatea anticorpului sau prezenţa unor substanţe marcate nedorite în trasor sînt uneori greu de evitat. Dimpotrivă, unii factori nespecifici datoraţi diferenţelor în compoziţia mediului de incubare pot fi mai uşor corectaţi. Totuşi, în lichidele biologice supuse analizei pot fi prezente enzime, proteine de legare sau alţi factori greu de detectat, care interacţionînd cu hormonul marcat, viciază rezultatul. Perturbarea sistemului prin substanţe nespecifice are loc fie prin alterarea constantei de echilibru a reacţiei avînd ca rezultat modificarea concentraţiei locurilor de legare, fie prin inhibarea sau potenţarea reacţiei dintre hormonul marcat şi anticorp etc. [19]. Modificarea concentraţiei locurilor de legare alterează distribuţia hormonului marcat în cele două compartimente (liber şi legat) în orice concentraţie s-ar afla în sistem. Inhibiţia reacţiei de legare este cu deosebire gravă cînd concentraţia locurilor de legare este modificată în condiţii în care hormonul marcat se află în concentraţie mică, la concentraţii mari, distribuţia hormonului marcat devenind relativ independentă de K şi de aceea efectul factorilor nespecifici este mai puţin grav [19]. Detectarea abaterilor severe de la regula specificităţii ideale, care pretinde relaţii univoce în reacţia dintre anticorp şi hormonul marcat sau cel rece, este unul din dezideratele primordiale ale validării unui sistem de analiză.

Nespecificitatea anticorpului devine evidentă în prezenţa probelor biologice care pot aduce în sistem o serie de substanţe capabile să reacţioneze cu anticorpul şi competiţionează cu intensităţi diferite cu antigenul marcat, influenţînd rezultatul dozării. Într-un sistem în care este implicată o singură specie de locuri de legare, extinderea reacţiei încrucişate se supune unei relaţii simple care defineşte activitatea relativă a oricărui cuplu de substanţe (H şi h) care reacţionează încrucişat în sistem :

$$\text{activitatea relativă} = \left(\mathrm{F} \times \frac{K_{\mathrm{H}}}{K_{\mathrm{h}}}\right) + \mathrm{B},$$

unde F = fracţiunea liberă a lui H marcat; B = fracţiunea legată a lui H marcat; K_{H} şi K_{h} = constantele de echilibru ale reacţiei lui H şi h respectiv, cu anticorpul [20]. Relaţia de mai sus presupune că hormonul marcat, *H, este identic cu H şi reacţionează cu aceeaşi constantă de echilibru.

Din această relaţie se poate deduce că activitatea relativă a celor doi compuşi, H şi h, variază în funcţie de gradul de legare al trasorului şi, implicit, curbele lor de răspuns, reprezentate în termeni de log [*H] nu sînt paralele decît dacă reacţionează cu energii identice. Se pare că sînt totuşi situaţii limită cînd abaterea de la paralelism nu este uşor de decelat [21].

În practică, apar frecvent dificultăţi în testarea şi interpretarea curbelor de diluţie din cauza gamei limitate a diluţiilor necunoscutei deoarece acestea pot conţine concentraţii reduse din substanţa de cercetat, cum este cazul concentraţiei hormonilor în LCR la normali. De aceea se recomandă adoptarea altei tactici, şi anume în locul diluţiei probei necunoscute se testează necunoscuta în prezenţa unor concentraţii diferite ale agentului de legare prin comparaţie cu standardul. Acest test este

Scanned with OKEN Scanner

încă mai sensibil şi pot fi sesizate orice diferenţe ale energiilor de legare între standard şi necunoscută.

Tehnicile de separare a substanţei marcate liberă de cea legată de anticorp reprezintă o altă sferă de influenţă asupra rezultatului probelor de identitate între standard şi proba necunoscută (vezi § 3.4) prin generarea nespecificităţii.

Nu trebuie uitate nici artefactele chimice datorate substanţelor introduse în sistem prin procedeele de extracţie de exemplu a steroizilor, a ACTH, a vasopresinei, manifestate prin valori negative sau pozitive ale „blancului". Negativitatea şi pozitivitatea blancului (a martorului tampon) reflectă condiţii neuniforme de-a lungul curbei doză-răspuns şi de aceea nu se poate justifica totdeauna eliminarea valorii lui prin calcul aşa cum se practică adesea [19].

4.3.3. VALIDAREA CALITATIVĂ (CLINICĂ)

Pentru a face eficientă o metodă de analiză hormonală, metodologia RIA ca şi metodologiile oricăror specii de analize (biologice, chimice) trebuie să prevadă ca nivelele de hormon măsurate să corespundă cu datele cunoscute ale fiziologiei şi fiziopatologiei hormonului. Eficienţa unui sistem de analiză cu radioliganzi este atestată prin concordanţa nivelelor de hormon observate cu fiziologia hormonului şi cu terapia [22]. Compararea cu dozările biologice este utilă cînd rezultatele sînt concordante, pe cînd discrepanţele nu invalidează metoda [4]. Pentru hormonii steroizi, compararea cu metodele chimice atestă şi completează rezultatele dozării în sistem cu radioliganzi.

Concordanţa cu fiziologia hormonului este demonstrată prin dispariţia hormonului din organismul în care glanda care îl produce a fost extirpată. Excepţiile de la această regulă sînt cazurile de producţie ectopică a hormonilor [23, 24]. După hipofizectomia chirurgicală şi hipofizoliza radioizotopică hormonii secretaţi de hipofiză dispar din circulaţia sanguină, sau concentraţia lor scade foarte mult, măsurarea prin metodele RIA fiind o probă demonstrativă a eficienţei ectomiei glandulare. Ablaţia glandulară este aplicată numai cazurilor patologice şi de aceea concordanţa cu fiziologia hormonală este demonstrată în clinica umană cu ajutorul probelor dinamice de stimulare sau de inhibiţie a secreţiei şi eliberării hormonului. Metodologia probelor dinamice s-a dezvoltat foarte mult odată cu disponibilitatea metodelor de analiză cu radioliganzi [25]. Creşterea nivelului seric al hormonului de creştere după administrarea substanţelor hipoglicemiante, a insulinei după glucoză, a gonadotrofinelor după administrarea factorilor de eliberare, a prolactinei după supt sau în stress-ul chirurgical sînt numai cîteva exemple. De asemenea, au fost observate efectele inhibitoare (supresoare) ale glucozei asupra hormonului de creştere, ale L-dopa asupra prolactinei, ale dexametazonei asupra ACTH, date care au permis descifrarea verigilor intermediare ale reglării secreţiei şi eliberării hormonale.

Capacitatea de a sesiza variaţii fiziologice ale unui hormon cum sînt cele generate de ritmurile biologice (nictemerale, menstruale, sezoniere, somn-veghe etc.) validează nu numai adecvabilitatea reactivilor dar şi sensibilitatea sistemului de analiză considerată în acest caz mai ales ca

Scanned with OKEN Scanner

posibilitate de a face o discriminare semnificativă între doze cu limite restrînse de variaţie [26].

În cursul terapiei de substituţie, nivelul hormonal observat trebuie să fie în acord rezonabil cu cel estimat ţinînd seama de doză, de calea de administrare, de repartiţia în masa sanguină etc. — ca de exemplu în cazul tratamentului cu gonadotrofine în insuficienţa hipofizară sau cu hormoni tiroidieni în hipotiroidie. Valorile hormonale observate după terapia cu doze farmacologice de hormon sînt în general mai mici decît cele aşteptate [22].

Pentru clinician, importantă este concordanţa nivelelor hormonale cu simptomatologia clinică. De remarcat totuşi că tocmai neconcordanţa acestora a dus la descoperirea, cu ajutorul metodelor RIA, a unor forme clinice necunoscute anterior cum este cazul nanismului hipofizar cu valori mari de hormon de creştere [27] explicabil prin deficitul factorului (factorilor) de sulfatare (somatomedina) [28].

Validarea calitativă prin compararea rezultatelor obţinute prin metode RIA sau înrudite cu cele obţinute prin metode biologice nu este totdeauna posibilă în cazul hormonilor polipeptidici, ca urmare a sensibilităţii reduse a metodelor biologice ca în cazul hormonului de creştere (tabela 4.3). Discrepanţele în compararea rezultatelor RIA cu rezultatele dozărilor biologice sînt frecvent observate în cazul hormonilor ectopici,

TABELA 4.3

Limita de sensibilitate a metodelor RIA şi a unor metode biologice

Hormon	RIA	Biodozare	
	sensibilitate	sensibilitate	metodă
HGH	0,02 ng/ml	20 μg	tibia test
TSH	5 μU/ml	20 μU/ml	metodă histometrică *in vivo*
FSH	1,5 mU/ml (II—IRP—HMG)	200 mU (II—IRP—HMG)	OAAD la şoarece
ACTH	10 pg/ml	200 pg	Corticosteronă în vena SR[a] la şobolan[b]
Prolactină	1 ng/ml	10—50 ng	test „local" pe guşa de porumbel
LPH (lipotropină)	20 ng/ml	2 μg/ml	eliberarea FFA din ţesutul adipos *in vitro*
Vasopresină (AVP)	10 pg/ml	0,5 μg/1mU	activitate presoare la şobolan
Vasotocină (AVT)	10 μU/ml (60 pg/ml)	1,5—5 μU (10—40 pg)	testul hidroosmozei pe vezica de broască

[a] Suprarenală.
[b] Hipofizectomizat.

a formelor moleculare considerate ca „precursori" ai hormonilor polipeptidici şi a formelor hormonale considerate ca forme moleculare „eterogene".

Proinsulina, care se găseşte în serul normal în concentraţii de 0,04—0,5 ng/ml reprezentînd 5—48 % din concentraţia insulinei imunoreactive, este biologic inactivă [29].

Descrierea unor forme moleculare ca „big-big insulina" [30—32], care după părerea autorilor ar reprezenta aproximativ 1 % din insulina imunoreactivă dozată în pancreasul normal sau în tumorile beta-insulare incită la reconsiderarea formelor de sinteză şi de secreţie a hormonilor corelat nu numai cu normalitatea ţesutului secretor ci şi cu normalitatea intensităţii de stimulare.

Boala Cushing observată la unii bolnavi cu cancer pulmonar [32—34] este datorată nu cantităţilor mari de „big ACTH" biologic inactiv ci unor mici procente de ACTH normal.

4.3.4. CRITERII DE COMPARABILITATE

Criteriile de apreciere a sistemelor de analiză cu radioliganzi pot fi grupate în trei categorii (tabela 4.4). Criteriile de compoziţie şi de funcţionalitate au fost discutate în capitolele şi paragrafele precedente. Dintre criteriile de fiabilitate, precizia şi exactitatea sînt şi criterii folosite pentru compararea rezultatelor în cadrul procesului de control al calităţii.

TABELA 4.4

Criterii de apreciere a sistemelor de analiză cu radioliganzi

Caracteristici ale metodei	Criterii	Exprimarea rezultatului
Compoziţie	puritate	procentual şi metoda
	stabilitate	condiţii şi durata
Funcţionalitate	specificitate	reacţii încrucişate: procentual şi substanţa
	sensibilitate	concentraţia
Comparabilitate	precizie	deviaţia standard sau coeficient de variaţie intra- şi interserii
	exactitate	
Practicabilitate	rapiditate	durata incubărilor: minute, ore, zile
	cost	lei/analiză
	competenţă tehnică	nr. analize/săptămînă şi condiţii: truse comerciale, reactivi prefabricaţi, truse proprii
	dependenţă	procentual faţă de totalul procedurii
	securitate	
	— de laborator	da, nu, ±
	— a mediului	da, nu, ±

Precizia (repetabilitatea sau reproductibilitatea) este definită [8] ca o măsură a concordanţei unei serii de valori obţinute pentru o singură probă cu valoarea medie a lor. Pentru evaluarea analitică a preciziei a fost propus indicele sau coeficientul de precizie lambda (λ) [35] definit ca raportul dintre deviaţia standard a lui logit B_1/B_0* pentru fiecare valoare a lui y şi panta liniei de regresie dintre valorile medii ale logit B_i/B_0 şi log x corespunzător [36]. Astfel definită, precizia include coeficientul de varia-

* $\text{logit}\ B_i/B_0 = \ln \dfrac{B_i/B_0}{1 - B_i/B_0}$.

Scanned with OKEN Scanner

bilitate, panta curbei doză-răspuns şi valoarea variabilei de răspuns (B_i/B_0 sau Y) la care se măsoară variaţia [8].

Precizia depinde de extensia schimbării (Δy) a variabilei de răspuns (y) la modificări (Δx) în concentraţia dozei (x) şi, spre deosebire de sensibilitate, este independentă de constanta de echilibru (K).

De remarcat că atunci cînd se efectuează determinări în lichide sau ţesuturi biologice care conţin cantităţi mari de hormoni, cum sînt ţesuturile glandulare, precizia determinării este mult mai importantă decît sensibilitatea sistemului.

Calculul indicelui de precizie (λ) arată variaţii în limite restrînse : 0,0309 pentru ACTH [37] sau 0,016—0,056 pentru insulină [38].

Precizia reprezintă deci o măsură a erorii prin variaţii necontrolate şi necesită un control permanent, de aceea metode statistice sau grafice maniabile sînt mult mai utile (vezi § 4.3.7). Calculul preciziei (deviaţie standard sau coeficient de variabilitate) permite supravegherea variaţiilor experimentale în cursul unei serii de dozări (intra-serie), între două sau mai multe serii de dozări (inter-serii), între executanţi diferiţi şi între laboratoare.

Exactitatea sau corespondenţa cu realitatea, se referă la măsura în care media unui număr infinit de determinări a unei substanţe concordă cu cantitatea reală a acelei substanţe rezultată dintr-o determinare standard. Rezultă din definiţie că asigurarea exactităţii necesită caracterizarea fără echivoc a substanţei care este analizată. Totuşi, cu excepţia hormonilor steroizi această asigurare nu este posibilă şi, în cazul hormonilor polipeptidici se apreciază prin aproximaţii „utile" ale valorii „reale" obţinute din estimarea exactităţii relative.

O metodă de apreciere a exactităţii relative în determinările cu radioliganzi este *compararea cu metode biologice adecvate*, luate ca punct de referinţă. Activitatea biologică netă a unei substanţe dintr-o probă nu corelează însă totdeauna pe baze molare cu concentraţia reală a antigenului. În plus, validitatea metodelor RIA cere numai identitatea comportamentului substanţei de măsurat şi a standardului în reacţiile imunochimice din sistemul de analiză. De aceea, este greu să se asigure dacă aceleaşi antigene folosite într-un sistem de dozare vor avea aceleaşi energii în reacţia antigen-anticorp atunci cînd nu au o sursă comună (specie, compartiment biologic, lot de extracţie sau de sinteză etc.). A fost observată o bună corelaţie între dozarea biologică şi cea radioimunologică a hormonilor hipofizei anterioare la om în extractele de urină [40—42]. Totuşi, standarde preparate dintr-o anumită sursă, ca de exemplu hipofiza, nu dau bune corelaţii între dozările biologice şi cele radioimunologice atunci cînd necunoscutele provin din surse diferite : ser, urină sau LCR. În dozarea LH a fost observat un grad mai mare de discrepanţe decît cu FSH, rezultat din pierderea parţială a activităţii imunologice cu conservarea celei biologice [43]. Mai mult, s-a demonstrat că metodele imunologice de determinare a HCG şi LH măsoară activităţi diferite de cele măsurate prin metode biologice [44, 45]. De aceea, este necesar să se indice sursa preparatului standard, unităţile şi comportamentul în sistemul de dozare folosit.

Alte metode de estimare a exactităţii relative : *acelaşi antigen este testat în sisteme RIA tehnic diferite* [40, 41, 42, 46] sau acelaşi antigen este testat în acelaşi sistem de dozare dar după ce a fost *supus la diferite manevre*

Scanned with OKEN Scanner

fizico-chimice (filtrare în gel, cromatografie, electroforeză, digestie enzimatică, diluţii) [8]. Proba de *recuperare a standardului in vitro* este încă o metodă care permite aprecierea exactităţii relative.

Exactitatea metodelor de analiză cu radioliganzi se bazează, cel puţin în parte, pe premisa (nu totdeauna realizabilă) că reacţiile care implică prezenţa hormonului marcat, a standardului şi a necunoscutei nu sînt influenţate de modificări ale mediului de incubare.

4.3.5. CRITERII DE PRACTICABILITATE

Tehnologia radioimunologică implică pregătire multidisciplinară: bio-, imuno- şi radiochimică, hormonologie, analiză statistică, de aceea dotarea laboratorului de radioimunologie cu personal calificat şi aparatură adecvată necesită estimarea judicioasă a posibilităţilor locale de realizare.

Practic, din punctul de vedere al competenţei, distingem trei categorii de laboratoare: determinări cu truse disponibile comercial, determinări cu prefabricate ceea ce implică procedee de marcare şi determinări cu sisteme de analiză realizate în laborator. Din punctul de vedere al responsabilităţilor, distingem laboratoare centrale şi laboratoare periferice, iar după localizare, ele sînt urbane şi rurale (tabela 4.5). În general, laboratoa-

TABELA 4.5

Clasificarea laboratoarelor de analiză cu radioliganzi

Modul de clasificare	Categoria	Procedee
A. Competenţă	Lucrează cu :	
	a) sisteme de analiză proprii	producţie reactivi, marcări, purificări; caracterizarea, optimizarea, validarea şi controlul de calitate al sistemelor de dozare;
	b) prefabricate	determinări cercetare ± rutină marcări, purificări; controlul de calitate al sistemelor de dozare;
	c) truse comerciale	determinări rutină ± cercetare determinări de rutină
B. Responsabilităţi	a) centrale	produc şi livrează reactivi şi seruri-test; determinări de referinţă (control de calitate inter-laboratoare); instruire cadre;
	b) periferice	determinări cercetare + rutină determinări de rutină ± cercetare
C. Adresabilitate	a) spitaliceşti	determinări rutină ± cercetare, producţie reactivi etc.
	b) industriale	determinări rutină pentru produse biologice industrializate (insulină, HCG, ACTH, HGH, antigen Australia etc.)
	c) cercetare	metodologie etc.
D. Localizare	a) urbane	vezi A. (a.b) şi B(a)
	b) rurale (în ţări dezvoltate)	vezi A.(c). şi B(b)

Scanned with OKEN Scanner

rele de analiză cu radioliganzi servesc spitale şi clinici, industria de medicamente şi cercetarea medico-biologică şi zootehnică. În ultimii ani, de acest tip de analize beneficiază şi instituţiile sportive.

— Prin *rapiditate* se înţelege numărul de analize pe unitatea de timp. În laboratoarele de biochimie, încă de peste un deceniu, aparatura automatizată a permis calculul rapidităţii ca număr de analize pe oră, pe cînd în laboratoarele de radioanalize numai în ultimul cincinal au putut fi realizate asemenea performanţe graţie evoluţiei automatizării. Totuşi, numai în centrele mari ale ţărilor dezvoltate au intrat în practică linii de lucru complet automatizate. În condiţii în care toate procedeele sînt efectuate manual, inclusiv măsurarea radioactivităţii, un laborator dotat cu un minimum de persoane calificate şi de aparatură poate efectua aproximativ 200—500 de determinări pe săptămînă lucrînd cu truse comerciale [1]. Comparativ cu metodele biologice, metodele cu radioliganzi au realizat un spor de randament echivalent cu cel puţin două ordine de mărime.

— *Costul* unei determinări prin tehnici cu radioliganzi reprezintă o rezultantă a costului calificării mîinii de lucru, reactivilor şi instrumentarului, a amortizării aparaturii etc. Costul ridicat al aparaturii nucleare face ca această tehnologie să fie greu accesibilă pentru multe instituţii spitaliceşti şi de cercetare, de aceea se impune o bună gospodărire şi organizare judicioasă a laboratoarelor. Experţii OMS [1, 3] sugerează modele de organizare a laboratoarelor centrale şi periferice cu scheme ale etapelor necesare pentru înfiinţarea unui laborator nou.

O sursă de economicitate este prepararea reactivilor proprii cel puţin pentru analizele solicitate în număr mare. Este de reţinut că un singur iepure care răspunde bine la imunizare poate asigura cîteva milioane şi zeci de milioane de determinări, iar la o marcare se poate obţine trasor pentru 5—10 000 analize (echivalînd cu porţia de trasor din 50—100 de truse comerciale!)

— Competenţa metodologică şi tehnică : analiza hormonală cu ajutorul truselor comerciale este atît de simplă încît aceste analize sînt efectuate deseori de către persoane necalificate, care necunoscînd sau neputînd înţelege capcanele acestor metode pot da rezultate greşite sau într-o interpretare neinformată cu repercusiuni asupra sănătăţii populaţiei [1]. De aceea se recomandă instruirea cadrelor timp de aproximativ 6—12 luni pentru tehnicile mai dificile şi învăţămîntul să fie aplicat cu ajutorul unor manuale de referinţă bune [1—3].

Practic, s-a observat o mai bună eficienţă atunci cînd un tehnician execută o singură tehnică, limitîndu-se migrarea de la o tehnică la alta. Atunci cînd acest deziderat nu este posibil, se foloseşte un singur „tip" de tehnică pentru mai mulţi hormoni, de exemplu tehnica cu dublu anticorp este mai uşor de aplicat la analiza mai multor substanţe şi mai uşor de preluat de la un tehnician la altul [2].

Durata învăţămîntului şi ritmul reciclărilor se aplică diferenţiat pentru personalul de conducere, de execuţie şi auxiliar şi în funcţie de categoria de laborator : central sau periferic.

— Interdependenţa laboratoarelor : dezvoltarea laboratoarelor pentru analize cu radioliganzi este dependentă de necesităţile (continue sau discontinue) naţionale, regionale sau locale. Laboratoarele periferice sînt dependente de laboratoarele centrale : un laborator central efectuează analize de referinţă pentru un număr de hormoni sau pentru un număr de laboratoare periferice şi, în plus, le pune la dispoziţie reactivi specifici.

Scanned with OKEN Scanner

La rîndul lor, laboratoarele centrale pot primi îndrumări metodologice de la un centru naţional orientat pe acelaşi profil de lucru. Calibrarea standardelor naţionale şi a celor regionale şi locale faţă de standardele internaţionale, este o altă latură a interdependenţei laboratoarelor de radioanaliză.

— Securitatea lucrului cu radioizotopi: deşi în mare majoritate analizele cu radioliganzi folosesc ^{125}I, izotop cu toxicitate medie, şi ^{3}H, cu toxicitate mică, totuşi, timpii lor de înjumătăţire (60 zile pentru ^{125}I şi 12 ani pentru ^{3}H) impun unele măsuri de protecţie a personalului şi a mediului ambiant. Unul din marile avantaje ale acestor metode este folosirea unor concentraţii foarte mici de reactivi, de ordinul a cîteva zeci de picograme sau mai puţin, ceea ce corespunde unor activităţi de ordinul a cîteva zeci de nanoCurie per probă. Astfel, pentru o serie de 100 de probe se manevrează aproximativ 2—5 μCi, activitate care obişnuit este inclusă în trusele de dozare şi pentru care se prevăd precauţii speciale. Condiţii de protecţie sînt necesare în timpul marcării cu radioizotopi şi în cursul purificării hormonilor marcaţi [47 — 49]. Regulile de protecţia lucrului cu radioizotopi în cadrul laboratoarelor sînt elaborate de instituţii naţionale [50—52], iar grija pentru protecţia mediului ambiant cade în sarcina instituţiilor naţionale şi a organizaţiilor internaţionale specializate [50—55].

4.3.6. CONTROLUL GLOBAL AL CALITĂŢII

Conceptul controlului statistic al calităţii rezultatelor datează de aproape trei decenii [56] şi este aplicabil oricărei producţii de serie. Teoretic, în producţia de serie, articolele rezultate ar trebui să fie identice dar în realitate există mici abateri de la specificaţiile admise, diferenţe care pot avea repercusiuni economice. Variabilitatea observată a fost clasificată [56] în variabilitate întîmplătoare datorată suprapunerii şi interrelaţiei unor mici efecte ale unor cauze prea numeroase şi tranzitorii pentru a putea fi analizate individual şi variabilitate datorată unor cauze detectabile. Dacă s-a reuşit ca produsul să fie acceptabil, atunci calitatea se poate menţine respectînd două condiţii: a) variabilitatea întîmplătoare să fie menţinută constantă şi b) variabilitatea din cauze detectabile să fie semnalată la timp şi să se aplice măsurile necesare pentru a le contracara. Procesul de producţie care este afectat doar de o variabilitate cu nivel constant este numit „sub control".

Laboratorul modern de chimie şi radiochimie clinică prezintă unele asemănări cu o linie de producţie industrială în general [57], în sensul că există la un cap o „intrare" a materialului brut şi la celălalt cap o „ieşire" a produsului. În sens larg, importantă este calitatea la ieşire, dar cum volumul produselor la ieşire este prea mare pentru a fi analizat individual, se recurge la controlul calităţii cu ajutorul procedeelor statistice. Într-un alt sens, rezultatele laboratorului clinic pot fi comparate cu produsele industriei medicamentelor şi ale aparaturii şi instrumentarului medical, a căror calitate are răsunet asupra stării de sănătate a populaţiei [2].

Analizele hormonale cu radioliganzi pun unele probleme speciale din punctul de vedere al controlului calităţii, probleme care sînt generate de instabilitatea reactivilor folosiţi în cantităţi trasoare şi de faptul că se lucrează cu reactivi care nu sînt „certificaţi". Eterogenitatea reactivilor esenţiali (antigenul marcat şi anticorpul) şi uneori lipsa preparatelor de

Scanned with OKEN Scanner

referință necesare duc la instabilitatea calității rezultatelor în laboratoarele individuale și la diferențe între laboratoare.

Toate aceste dificultăți sînt suficiente argumente pentru organizarea, la nivel național și internațional, a măsurilor pentru aplicarea unui control de calitate riguros [2].

Organizația Mondială a Sănătății (OMS), prin experții săi, desfășoară o activitate susținută în scopul de a asigura calitatea sistemelor de dozare cu radioliganzi cu aplicabilitate în medicina umană. În rapoartele tehnice asupra standardizării biologice [1, 2] sînt prezentate detaliat recomandările pentru controlul calității materialelor folosite în sistemele de dozare imunochimică și propuneri pentru un sistem național de „servicii' pentru analiza hormonilor și a altor substanțe necesare îngrijirii sănătății populației. În plus, au fost stabilite *preparate de referință internaționale* pentru determinarea imunochimică a concentrației acelor hormoni care sînt frecvent folosiți. Laboratorul internațional pentru standarde biologice al OMS cu sediul la Londra are, între altele, sarcina de a elabora standarde internaționale, preparate de referință și reactivi de referință [58]. În plus, OMS a întreprins în 100 laboratoare studii pilot asupra controlului extern al calității metodelor de dozare cu radioliganzi pentru o serie de hormoni steroizi și polipeptidici. Rezultatele au arătat coeficienți de variabilitate inter-laboratoare de ordinul a 30% pentru prolactină și de 15% pentru cortizol, ceea ce trădează o împrăștiere destul de mare a rezultatelor [2], cu deviația standard de două ori mai mare decît cea așteptată.

La solicitarea OMS, Federația Internațională a Chimiei Clinice (IFCC) a întreprins un vast program pentru controlul calității truselor comerciale și al instrumentarului, pentru analiza unor intervale de referință necesare pentru definirea „normalității", pentru programele educație și învățămînt [59].

O contribuție substanțială în domeniul standardizării și controlului calității metodelor de analiză cu radioliganzi este datorată Agenției Internaționale pentru Energia Atomică (AIEA), care a organizat reuniuni și simpozioane cu această temă [60—62] și cursuri de inițiere între anii 1971 și 1975. Documente care conțin măsuri privind controlul calității produselor necesare determinărilor prin tehnici cu radioliganzi (reactivi și truse) au fost acceptate ca legi (S.U.A.) sau ca ghid orientativ (R.F. Germania) și se preconizează ca pînă în anul 1980 legislații adecvate să fie aplicate în toate țările Europei [2].

— *Surse de eroare ale rezultatului analizelor cu radioliganzi.* În strategia unui diagnostic eficient, cu cît datele clinice sînt mai exacte cu atît numărul probelor de laborator pentru diagnostic este mai redus, iar proba de laborator nu are nici o valoare dacă nu este interpretată într-un *context* clinic corect [2].

Circuitul pacient—medic—*laborator*—medic—pacient include o suită de etape (fig. 4.1), a căror supraveghere atentă asigură corectitudinea rezultatelor. Analiza acestor etape arată că rezultatele cantificării prin metodele cu radioliganzi sînt pîndite de numeroase erori sistematice (măsluiri) și de erori datorate unor variații necontrolate sau necontrolabile (tabela 4.6).

Nu rareori pot fi observate și erori supreme sau „gafe" și acestea trebuie evitate prin informare adecvată și susținută. Cîteva exemple arată cît de ușor pot fi obținute rezultate grosolan deviate. În etapa pacient-medic, la scurt interval după administrarea insulinei, a STH sau ACTH se cere dozarea acestor hormoni, sau se cere dozarea LH după administra-

Scanned with OKEN Scanner

rea HCG sau a prolactinei bazale la pacienţi în tratament cu psihotrope. O atenţie specială necesită preparatele hormonale şi nehormonale cu resorbţie lentă. Gafele în interiorul laboratorului sînt relativ uşor de

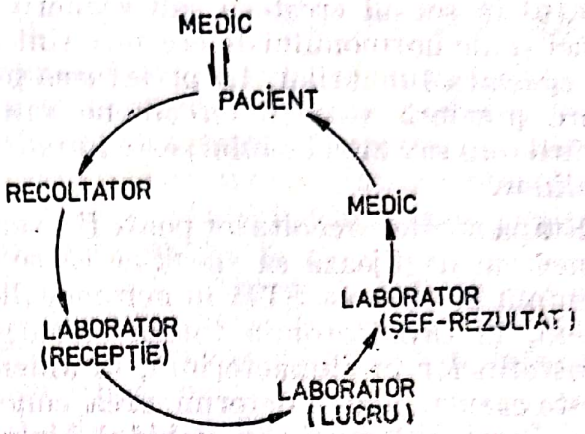


Fig. 4.1. — Etape expuse erorilor în circuitul pacient — medic — laborator — medic — pacient.

detectat : dozări în eprubete contaminate, distribuţia greşită a reactivilor (al doilea anticorp în locul primului anticorp, schimbarea reactivilor în dozări paralele ca acelea pentru LH şi FSH), abateri de la protocolul tehnici-

TABELA 4.6

Surse ale erorilor sistematice şi necontrolabile în circuitul pacient — medic — laborator — pacient şi posibilităţi de evitare

Etapa	Surse ale erorilor	Precauţii
1. Medic → pacient	medicamente alimentaţie stress ritmuri biologice proba dinamică	— instruirea pacientului
2. Pacient → recoltator	stress venepuncţie orarul prelevărilor codificarea probei etichetarea probei	— broşuri cu instrucţiuni — ac à demeure — codificare simplă, clară
3. Recoltator → recepţie laborator	interval expediţie înregistrare	— simplificarea formelor de înregistrare
4. Laborator lucru a) prelucrare probe	codificare separare chiag centrifugare etc. conservare	— instructaj personal
b) analiză	codificare pipetare (probe / reactivi) tehnică separare sticlărie alterare reactivi schimbare tehnician măsurare schimbare aparat sistem interpolare calcul	cartele de control
5. Laborator (şef-rezultate)	preparat de referinţă exprimarea rezultatelor interpretarea rezultatelor limite normalitate	
6. Laborator → medic	eliberarea buletinului	
7. Medic → pacient	corelarea rezultatului cu starea bolnavului	

Scanned with OKEN Scanner

lor de separare (contact prelungit cu cărbune dextran, pierderea precipitatului) etc.

În cursul aceleiaşi etape, unele greşeli aparent minore pot modifica rezultatul în sensul creşterii sau scăderii în funcţie de hormon. Valorile insulinei şi ale hormonului de creştere sînt influenţate de ingestia alimentelor, în special a dulciurilor. La prelevarea probelor pentru dozarea hormonilor care prezintă variaţii circadiene sau ciclice, stabilirea momentului prelevării (ora sau ziua ciclului) este importantă pentru aprecierea corectă a anomaliilor.

Etapa medic—recoltator poate fi o sursă de risipă de timp şi de reactivi cînd medicul neglijează să specifice că se suspectează valori foarte mari, de exemplu la dozarea STH în acromegalie sau la nou născut, a TSH în mixedem, în tiroidectomia totală chirurgicală sau radioizotopică sau a gonadotrofinelor în climacterium, în amenoreea de origine periferică etc. În aceste cazuri, pentru determinarea concentraţiei, se pun la început în lucru volume adecvate din lichidul biologic cercetat; altfel, valorile se înscriu în zona dozelor maxime unde variabilitatea este mare în comparaţie cu zona de mijloc a curbei.

La recoltarea probelor de sînge pentru probe dinamice cu durată de mai multe ore şi prelevări frecvente, venepuncţia repetată poate fi o sursă de stress neomogen care modifică uneori rezultatele, de aceea se preferă ace à demeure, siliconate sau heparinate, perfuzii lente, cateterizarea venei etc.

O abatere frecventă de la uniformitatea condiţiilor de prelevare şi conservare a probelor de sînge este variabilitatea în limite foarte largi (de la cîteva minute la ore şi zile) a intervalului de la recoltare pînă la separarea serului sau plasmei. De exemplu, cînd se recoltează plasmă pentru determinări hormonale pe o singură probă (condiţii bazale), centrifugarea se face după cîteva minute, pe cînd într-o probă dinamică de 3 — 4 ore, serul este separat de chiag la un interval de 30—60 minute după recoltarea ultimei probe. Cînd probele sînt aduse de la alt spital la sfîrşitul sau după terminarea zilei de lucru, ele sînt centrifugate uneori a doua zi.

Controlul de calitate intern şi extern. Metodele analitice sînt descrise cu ajutorul caracteristicii performanţelor lor : specificitate, exactitate, precizie şi sensibilitate numite împreună cu termenul global de fiabilitate şi prin criterii de practicabilitate (vezi § 4.3.5).

Controlul calităţii în sens restrîns se limitează la acele erori care cad în responsabilitatea laboratorului (tabela 4.6).

În cadrul laboratorului, deosebim *endocontrolul* efectuat de către personalul laboratorului sub supravegherea conducătorului său şi un *exocontrol* efectuat periodic de către un laborator de referinţă regional, sau ocazional de către un laborator regional [63], naţional [64, 65] sau internaţional [66].

Materiale necesare pentru controlul calităţii: a) standard primar; b) seruri de control rezultate din amestecuri de lichide biologice distribuite sub formă lichidă, congelate sau liofilizate, acestea putînd servi şi ca standard secundar ; c) tehnici de referinţă.

Tehnica endocontrolului prevede cîteva faze succesive şi anume : a) se aleg 30—50 probe selecţionate din toate nivelele de doze întîlnite cu metoda pe care o controlăm, eventual sînt amestecuri de probe care au rămas de la dozări anterioare ; b) se determină pe aceste probe repetabilitatea sau precizia *intraserie* (intralot) în două variante alternative — fie 30—50

determinări pe o aceeaşi probă (cînd avem suficient) şi se calculează media şi deviaţia standard după metodele uzuale, fie duplicate pe 30—50 probe şi se calculează deviaţia standard a diferenţelor după formula $DS = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$, unde d este diferenţa între partenerii perechilor, iar n numărul de perechi ; c) repetabilitatea *interserii* (interloturi) se calculează cu ajutorul rezultatelor obţinute prin determinările făcute pe probe în duplicat incluse în mai multe serii de dozare succesive. Formula de calcul este aceeaşi ca pentru intralot considerînd un partener al duplicatului rezultatul într-o primă dozare şi celălalt partener pe cel obţinut în următoarea ş.a.m.d. Se mai poate calcula şi varianţa (DS^2) interserii.

Calculul *exactităţii* este ceva mai dificil şi pentru aceasta este necesar să comparăm rezultatele obţinute cu rezultatul obţinut cu ajutorul unei metode de referinţă (în cadrul aceluiaşi laborator sau într-un laborator de „service" regional, naţional sau internaţional).

Se calculează diferenţele $d_1, d_2, \ldots, d_n$ între rezultatul obţinut cu metoda pe care o controlăm şi rezultatul tehnicii de referinţă efectuat pe n probe şi se aplică formula

$$\bar{d} = \sum \frac{d_i}{n}$$

sau, se poate calcula varianţa diferenţelor

$$DS^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{(d_i)^2}{n}}{(n-1)}.$$

Limitele de confidenţă 95% în δ, valoarea „reală" a metodei sînt date de

$$\bar{d} \pm t \times \frac{DS}{\sqrt{n}},$$

unde t = valoarea 95% a testului „t" Student cu n-1 grade de libertate. Această formulă oferă unele indicaţii asupra gradului de exactitate cu care a fost asigurată determinarea.

În absenţa unei tehnici de referinţă sau de control ca în cazul unor laboratoare izolate sau plasate într-o atmosferă necooperantă, au fost propuse cîteva căi prin care se poate ajunge la asigurarea exactităţii rezultatelor [67] : a) se compară rezultatele obţinute pe probe şi normale şi patologice cu cele obţinute de un alt laborator care foloseşte aceeaşi metodă ; b) se compară rezultatele obţinute pe probe şi normale şi patologice cu cele obţinute cu o metodă de referinţă în acelaşi laborator sau în altul ; c) se compară valorile normale obţinute cu cele care au fost publicate ; d) se supun analizei probe speciale, normale şi patologice, ale căror valori au fost deja stabilite ; e) se adaugă substanţă pură la probe şi se calculează recuperarea (rezultatul aditiv) ; f) se fac probe de specificitate adăugînd cantităţi variabile din substanţe care teoretic ar trebui să interfereze în sistem.

Controlul preciziei intraserie şi interserii pe un număr mare de probe se efectuează discontinuu, de exemplu interserii odată la 4—5 serii.

Scanned with OKEN Scanner

Practic însă, controlul se poate efectua continuu cu ajutorul replicatelor pe trei nivele de concentraţii şi cu înscrierea rezultatelor pe graficul de control. În chimia clinică sînt folosite diferite modele de grafice de control [57], graficul sumei cumulative cunoscut ca graficul cusum [68, 69], fiind cel mai sugestiv (fig. 4.2).

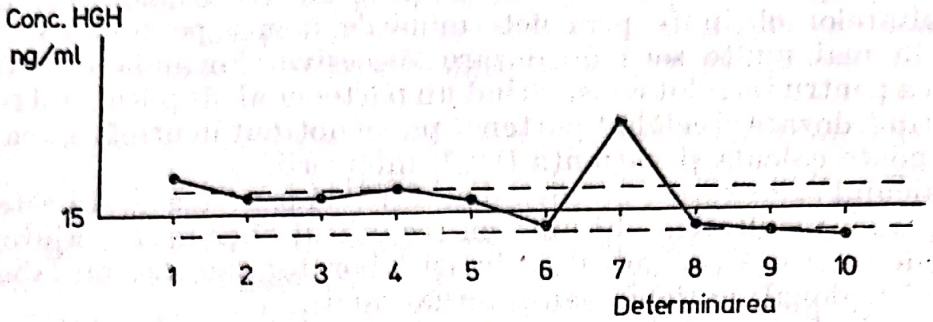


Fig. 4.2. — Harta Cusum pentru 10 curbe standard efectuate la diferite intervale, pe timp de un an, la Institutul de endocrinologie, laboratorul de radioimunologie. Valoarea ţintă = 15 ng/ml a fost determinată de mai multe ori pe acelaşi amestec de seruri, în sistem RIA al HGH. – – – = 2 deviaţii standard ale valorii ţintă; ——— = curba reprezentînd însumarea abaterii valorilor găsite la determinările 1, 2,..., 10, faţă de valoarea ţintă. Se observă că la determinarea nr. 7, sistemul RIA a fost grav perturbat.

Controlul extern sau exocontrolul calităţii se bazează pe aceleaşi principii ca şi controlul intern.

Practic, se distribuie laboratoarelor participante un număr de probe, în general nu peste 20, numerotate la întîmplare. Rezultatele sînt calibrate de participanţi fie faţă de o curbă comună pentru toţi, fie faţă de o a doua curbă trasată cu ajutorul unui standard care este distribuit odată cu probele. Probele în triplicat sînt interpolate pe curba standard obişnuită a laboratorului, pe curba comună şi pe curba construită cu ajutorul standardului primit odată cu probele. Se calculează pe triplicate variabilitatea intraserie şi coeficientul de variabilitate interlaboratoare. Rezultatele obţinute de fiecare laborator sînt înscrise pe histograma distribuţiei frecvenţelor, care, cel puţin la debuturile acestui tip de control, arată dispersia foarte largă a valorilor, de exemplu între 5 şi 200 mU/l TSH cînd citirea probelor s-a făcut pe curba reală şi între 5 şi 35 mU/l cînd citirea s-a făcut pe curbe de recuperare (în prezenţa serului fără TSH), valoarea adevărată fiind aproximativ 17,5 mU/l [11]. Alte histograme ale distribuţiei frecvenţelor în controlul RIA al insulinei au arătat variaţii între 0 şi 110 μU/ml [64].

4.3.7. CONSIDERAŢII MATEMATICE

Structura locurilor de legare de pe molecula antigenului sau a substanţei neantigenice şi a situsurilor de combinare ale anticorpului (sau ale altei proteine de legare) nu este cunoscută (vezi 2.1.5.) de aceea tentativa de a da o bază teoretică sistemelor de analiză cu radioliganzi este firesc să pornească de la modele simplificatoare.

Cele trei grupuri de cercetători, care au acordat atenţie teoretizării acestor sisteme şi anume R.S. Yalow şi S.A. Berson [70—73], R.P. Ekins

Scanned with OKEN Scanner

și colab. [6, 9, 19, 20, 21, 74, 75], H. Feldman [76, 77], D. Rodbard și colab. [10, 13, 15, 78—81] au folosit același model fundamentat pe o suită de aproximații care vizează reactivii de bază și interacțiunile lor în sistemul de analiză la echilibru.

Teoria matematică a sistemelor RIA [19, 70, 76] are la bază următoarele presupuneri:

1) antigenul (sau o substanță neantigenică) se află în sistem sub formă omogenă alcătuit din o singură specie chimică; 2) anticorpul (sau o proteină de legare) este prezent în o singură formă chimic omogenă sau, poartă o singură specie sau un singur ordin de situsuri de combinare; 3) atît antigenul cît și anticorpul sînt monovalente, adică un anumit antigen poate reacționa cu o moleculă de anticorp și nu pot apărea alte combinații; 4) nu apar efecte alosterice sau de cooperare moleculară adică reacția dintre antigen și anticorp se supune legii acțiunii maselor de ordinul întîi (cinetică chimică de ordinul doi); 5) antigenul radiomarcat și antigenul nemarcat au aceleași proprietăți fizicochimice (exceptînd prezența trasorului pe cel radioactiv) și se comportă identic în sistem; 6) reacția dintre antigen și anticorp atinge echilibrul chimic în cursul incubării; 7) compartimentele „legat" și „liber" ale antigenului marcat pot fi separate perfect fără a influența sau perturba echilibrul; 8) pentru citirea radioactivității celor două compartimente dispunem de un sistem de măsurare perfect.

Deși aceste presupuneri nu sînt realiste, totuși cu ajutorul lor se pot obține informații descriptive, ecuații utile pentru caracterizarea reactivilor și pentru selecționarea concentrației optime a lor, pentru a prevedea gradul de sensibilitate, specificitate și de precizie a unui sistem de analiză sau pentru studii ale cineticii reacțiilor. Ecuațiile care au fost obținute în acest fel au servit ca algoritmuri pentru calculul programat și, în general, pentru procesul de automatizare.

Ecuații pentru descrierea sistemului de analiză. Cel mai simplu portret al sistemelor de analiză cu radioliganzi se bazează pe legea acțiunii maselor, descriind simbolic reacția ca

$$S + P \rightleftarrows SP$$

unde S = substanța supusă analizei, iar P = proteina de legare.

La echilibru, conform legii acțiunii maselor de ordinul întîi (cinetica chimică de ordinul doi), avem

$$K\,[S]\,[P] \rightleftarrows [SP] \qquad (4.1)$$

unde [S] = concentrația lui S; [P] = concentrația lui P, iar K = constanta de echilibru.

Pentru substanța marcată avem ecuația

$$^*K\,[^*S]\,[P] \rightleftarrows [^*SP] \qquad (4.2)$$

Folosind aceste ecuații (4.1) și (4.2), s-a trecut la analiza și descrierea curbelor doză-răspuns folosind fie aproximarea acestor curbe cu o hiperbolă [19], fie cu o dreaptă rezultată dintr-o transformare empirică logit a variabilei de răspuns versus log doză [13].

Pentru aproximarea curbei doză-răspuns, cu o hiperbolă [19] a fost ales raportul legat (B) vs. liber (F) sau F vs. B ca variabile de răspuns.

Scanned with OKEN Scanner

Concentraţiile iniţiale ale lui S şi P se notează cu s şi p. Deci raportul f/b poate fi exprimat astfel :

$$Rf/b = \frac{[S]}{[SP]}, \tag{4.3}$$

unde

$$[S] = s - [SP] \tag{4.4}$$

şi

$$[P] = p - [SP], \tag{4.5}$$

de aici

$$Rf/b = \frac{s-[SP]}{[SP]}, \tag{4.6}$$

de unde rezultă

$$[SP] = \frac{s}{Rf/b + 1}. \tag{4.7}$$

Combinînd ecuaţiile (4.1), (4.4.), (4.5) şi (4.7) se obţine

$$K\left(s - \frac{s}{Rf/b + 1}\right)\left(p - \frac{s}{Rf/b + 1}\right) = \frac{s}{Rf/b + 1}, \tag{4.8}$$

care prin rearanjare dă

$$R^2f/b + Rf/b\left(1 - \frac{s}{p} - \frac{1}{Kp}\right) - \frac{1}{Kp} = 0 \tag{4.9}$$

sau

$$\frac{1}{Rf/b} = \frac{p}{\dfrac{s}{1 + \left(\dfrac{1}{Rf/b}\right)} + \dfrac{1}{K}}. \tag{4.10}$$

Exprimate în termeni de Rb/f ecuaţiile (4.8) şi (4.9) devin

$$R^2b/b + Rb/f\ (1 + Ks - Kp) - Kp = 0. \tag{4.11}$$

şi

$$Rb/f = \frac{p}{p/(1 + Rb/f) + 1/K}. \tag{4.12}$$

Ecuaţiile (4.9) şi (4.11) reprezintă hiperbole (fig. 4.3). Pot fi deduse ecuaţiile asimptotelor, iar pantele şi distanţele la origine ale acestor asimptote pot fi calculate.

Din aceste calcule rezultă că una din asimptote, pentru curbele în Rf/b şi în cele Rb/f este chiar abscisa, adică axa dozei. Cealaltă asimptotă

Scanned with OKEN Scanner

are, pentru curba în Rf/b, o pantă egală cu $1/p$ şi ordonata la origine (axa raportului) de $\frac{1}{Kp} - 1$; asimptota curbei în Rb/f are o pantă egală cu $-K$ şi intersectează axa raportului la $Rb/f = Kp - 1$.

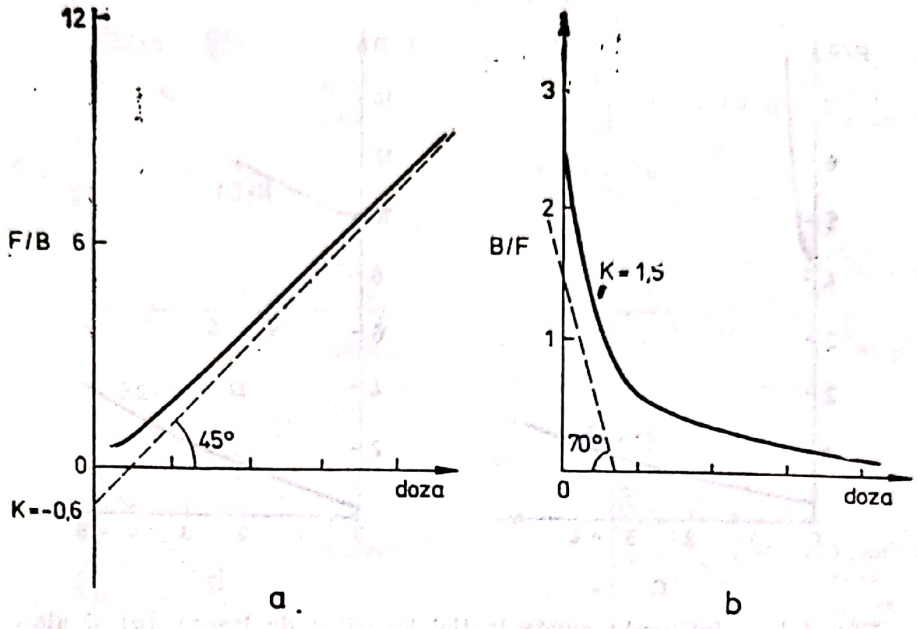


Fig. 4.3. — Reprezentarea grafică a ecuaţiilor (4.9) (*a*) şi (4.11) (*b*). Valorile lui *p* şi *K* au fost alese arbitrar egale cu 1,0 şi 2,5 respectiv [19]. ——= curba; — — —asimptota ramurii dată de valorile pozitive ale raportului şi ale dozei. Rezultă că în (*a*) panta este 1 şi ordonata la origine este −0,6, iar în (*b*), panta este −2,5 şi ordonata la origine este 1,5.

Din aceste ecuaţii rezultă că în reprezentarea curbelor doză-răspuns cu variabilă de răspuns raportul F/B şi panta egală cu reciproca concentraţiei locurilor de legare (anticorp, proteine receptoare etc.), cu cît concentraţia proteinei de legare va fi mai mică cu atît panta va fi mai abruptă, chiar dacă constanta de echilibru nu este prea mare (fig. 4.3) [19].

Reprezentarea curbei folosind ca variabilă de răspuns raportul B/F nu permite observarea directă, prin simpla inspecţie a curbelor, a acestei relaţii, reprezentarea sub această formă arătînd clar dependenţa pantei de mărimea constantei de echilibru, şi anume, panta este cu atît mai abruptă cu cît K este mai mare (fig. 4.4 şi 4.5) şi, implicit, sensibilitatea mai bună.

Deşi ecuaţiile (4.1) — (4.11) au fost derivate pornind de la premisa că în sistem acţionează o singură specie de locuri de legare, aceste ecuaţii concordă destul de bine cu rezultatele experimentale care arată că reducerea concentraţiei proteinei de legare duce la creşterea pantei curbei doză-răspuns. Concentraţiile foarte reduse ale reactivilor în sistemul de dozare fac ca influenţa populaţiilor contaminante, aflate în cantităţi mai mici, să diminueze astfel încît pentru multe sisteme de analiză, ecuaţiile pot fi suficiente.

Cu toate acestea, în practică deseori curbele experimentale prezintă abateri de la aspectul de hiperbolă dînd, la reprezentarea F/B funcţie de doză, segmente de parabolă, sigmoide etc. Sursa principală a acestor abateri este prezenţa în sistem a multiple reacţii de legare date de specii moleculare diferite şi care posedă constante de afinitate diferite.

Presupunînd că în sistem avem P_i ($i = 1, 2, 3, \ldots, n$) specii de proteine de legare, reacţia globală poate fi dată de expresia

$$S + P_i = SP_i$$

şi ecuaţia (4.1) devine

$$K_i[S][P_i] = [SP_i]. \tag{4.13}$$

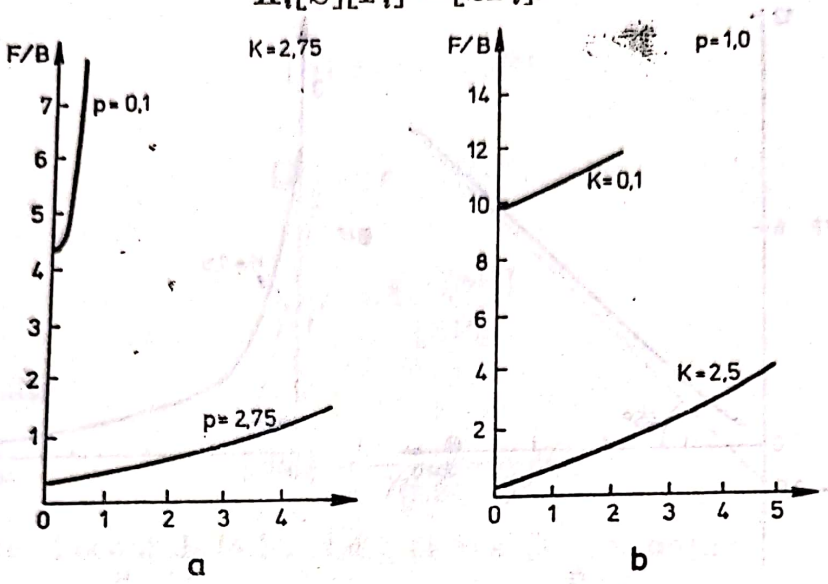


Fig. 4.4. — Influenţa concentraţiei locurilor de legare (*a*) şi ale constantei de echilibru (*b*) asupra curbei doză-răspuns cînd variabila de răspuns este raportul F/B [19].

Integrînd şi folosind raţionamente analoge ecuaţiilor (4.1) — (4.12) [19], se obţine forma generalizată a ecuaţiei (4.10) corespunzătoare :

$$\sum_i^n \frac{p_i Rf/b(Rf/b+1)}{Rf/b\ s + (Rf/b/k_i) + (1/k_i)} = 1. \tag{4.14}$$

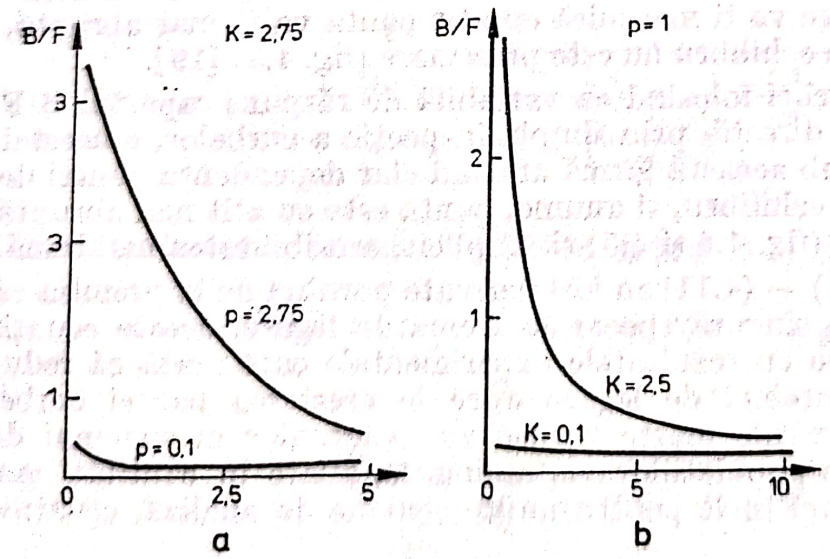


Fig. 4.5. — Influenţa concentraţiei locurilor de legare (*a*) şi ale constantei de echilibru (*b*) asupra curbei doză-răspuns cînd variabila de răspuns este raportul B/F [19].

Panta asimptotei la curba în Rf/b este egală cu $1/\sum p_i$, iar ordonata la origine este dată de ecuaţia

$$Rf/b = \frac{\sum p_i/K_i}{(\sum p_i)^2} - 1. \tag{4.15}$$

Scanned with OKEN Scanner

Pentru *calculul constantei de echilibru* K s-a folosit liniarizarea reprezentării legii acțiunii maselor de ordinul întîi introdusă de Scatchard [82] prima oară pentru interacțiunile proteinelor cu molecule mici, cunoscută sub numele de reprezentarea Scatchard aplicată de Berson și Yalow la sistemele RIA [70—73].

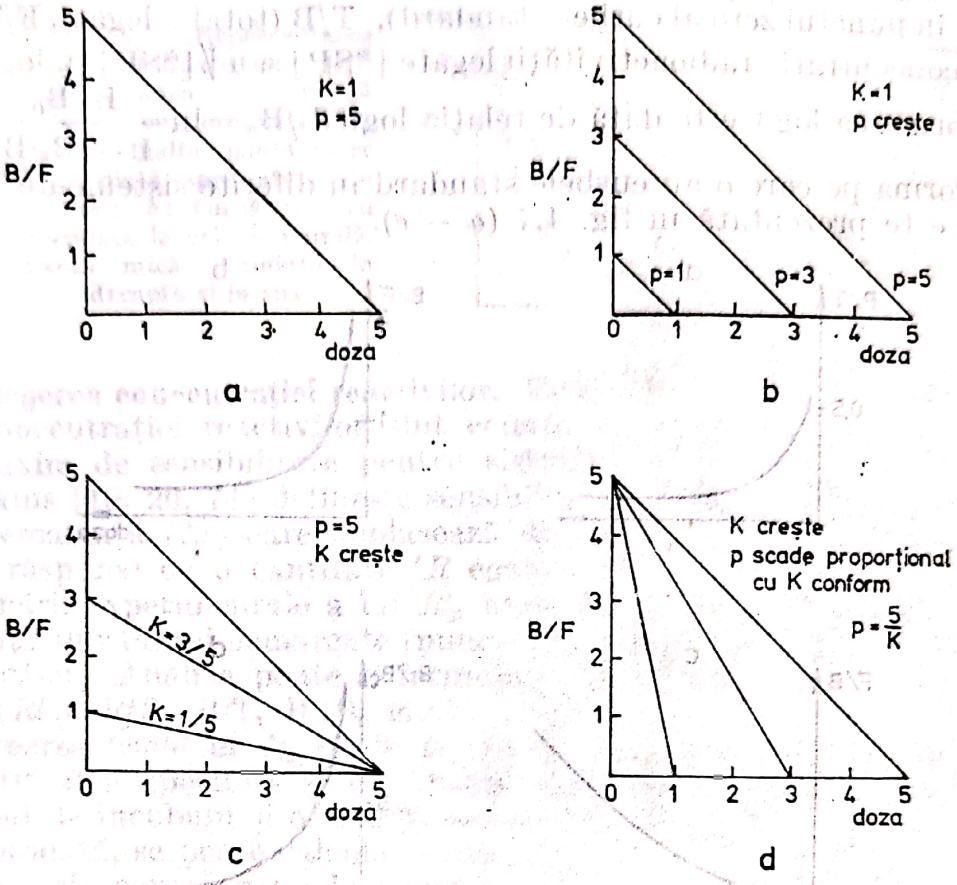


Fig. 4.6. — Reprezentarea Scatchard teoretică este o dreaptă cu panta -k, distanța la origine = p și ordonata la origine = Kp. În (a) $K = 1$ și $p = 5$; (b) = menținînd constanta de afinitate K la valoarea 1 și crescînd concentrația proteinei de legare p, curbele comută spre dreapta, dar panta rămîne nemodificată; (c) cînd concentrația proteinei de legare rămîne aceeași și constanta de echilibru crește, curbele pivotează în jurul distanței la origine; (d) cînd K crește, iar p scade proporțional, curba pivotează în jurul ordonatei la origine, evoluînd către stînga și devenind din ce în ce mai abruptă [76, 77].

Din ecuațiile reacțiilor de asociere și de disociere se deduce [76] ecuația

$$Rb/f = K(p - S), \qquad (4.16)$$

care arată că există o relație liniară între raportul B/F și concentrația substanței legate. Reprezentarea grafică a ecuației (4.16) în termeni de raport legat /liber funcție de concentrația substanței legate este cunoscută sub numele de reprezentarea Scatchard (fig. 4.6). Această reprezentare permite estimarea constantei de echilibru K și concentrația totală a situsurilor de combinare ale proteinei de legare (p).

Practic, o reprezentare Scatchard se obține din datele experiențelor efectuate cu anumite precauții [9, 83].

Potrivirea datelor reale prin metode grafice sau statistice (cele mai mici pătrate) în termeni de B/F funcție de doză înscrie o linie dreaptă cu ajutorul căreia se poate estima K pentru orice sistem de analiză real.

Sistemul de coordonate în care poate fi înscrisă curba doză-răspuns este alcătuit din doză-(concentrația substanței de dozat) înscrisă invariabil pe abscisă în scara aritmetică sau logaritmică și variabila de răspuns înscrisă pe ordonată. Sînt utilizate peste zece modalități de exprimare ale variabilei de răspuns : B/T (legat : total), B/F (legat : liber) ; F/B (liber : legat), B_i/B_0 (legat în probele dozei $i = 1, 2, 3, \ldots, n$ versus legarea în punctul zero al curbei standard), T/B (total : legat), F/T (liber : total), concentrația radioactivității legate [*SP] sau $\sqrt{[*SP]}$ și, logit B_i/B_0. Transformarea logit este dată de relația $\text{logit}B_i/B_0 = \ln \frac{B_i/B_0}{1 - B_i/B_0}$.

Forma pe care o au curbele standard în diferite sisteme de înscriere grafică este prezentată în fig. 4.7 (a — e).

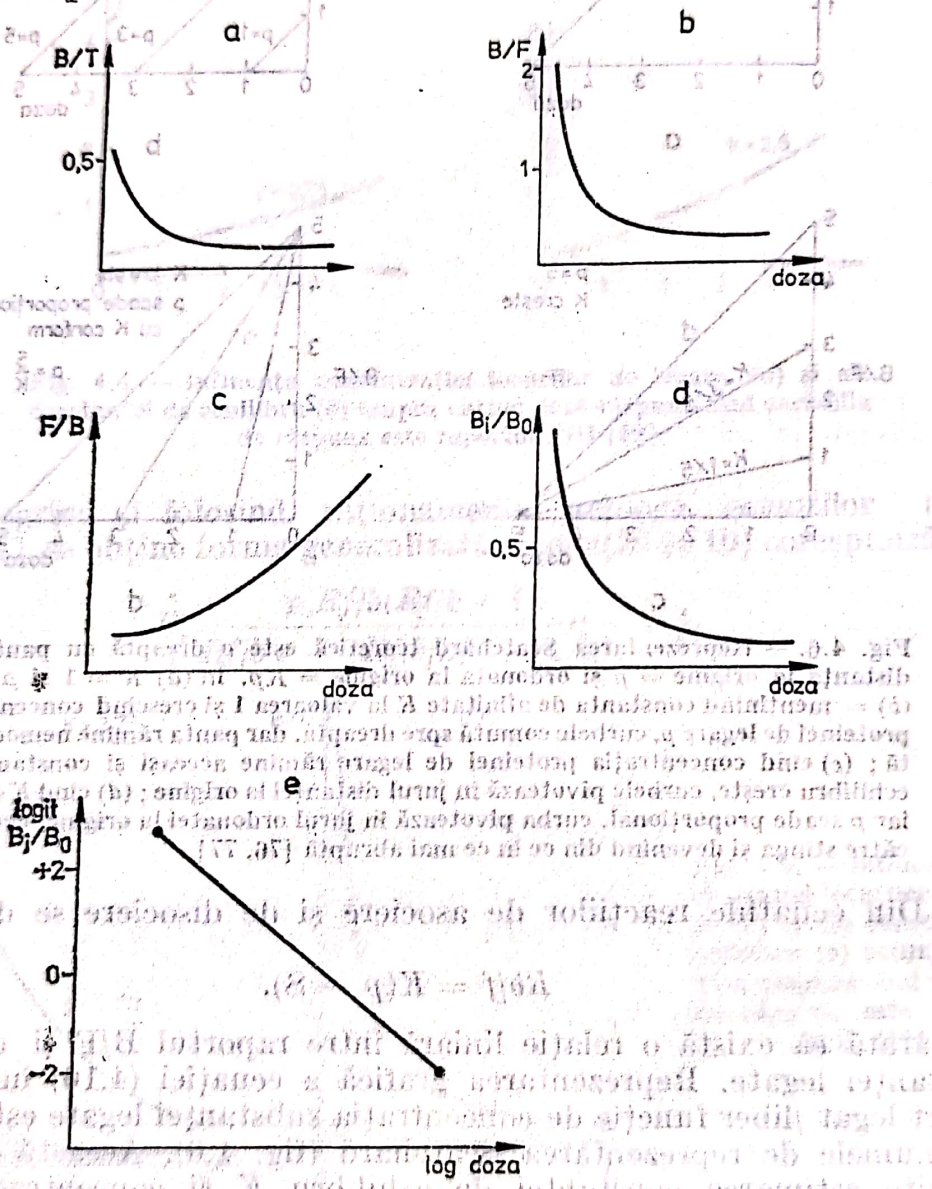


Fig. 4.7. (a, b, c, d, e). — Forma curbei standard în diferite reprezentări ale variabilei de răspuns.

Analiza curbelor doză-răspuns permite calculul parametrilor care definesc sistemul în ansamblu : panta, ordonata la origine, sensibilitatea, specificitatea și precizia, dar și reactivii — de exemplu constanta de afinitate K.

În mare, o curbă *bună* are o mare ordonată la origine (la reprezentarea B/F funcție de doză), panta mare și tinde spre stînga și în jos; una *rea* are ordonată la origine mică la B/F, panta mică și „trage" spre dreapta și în sus (fig.4.8).

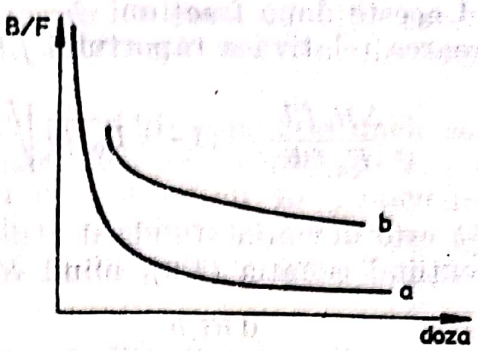


Fig. 4.8. — Reprezentarea curbei standard ca B/F versus doza -*a*: curbă corectă cu ordonată la origine înaltă, pantă mare și tendință spre stînga și în jos; *b*: curbă rea cu ordonată la origine scundă, pantă mică, tendință la dreapta și în sus.

Alegerea concentrației reactivilor. Ecuațiile care servesc pentru alegerea concentrației reactivilor sînt ecuații elaborate în scopul realizării unui maxim de sensibilitate pentru sistemele de dozare.

Ekins [19, 20, 74] definește sensibilitatea ca acea cantitate de substanță nemarcată (Δs) care deplasează distribuția radioactivității (variabila de răspuns) cu o cantitate $'R$ egală cu *o deviație standard* (ΔR_0) a determinării experimentale a lui R_0, unde R_0 reprezintă raportul obținut în absența substanței nemarcate (punctul zero al curbei standard sau martorul antiser). Analiza poate fi formulată în termeni de orice raport cunoscut (Rb/f, Rf/b, B/T, B_i/B_0 etc.).

Eroarea totală în R_0 poate fi calculată cunoscînd cîțiva parametri ca: activitatea specifică și cantitatea substanței marcate adăugată în amestecul de incubare și erorile generate de tehnica de separare.

Totodată, se poate calcula *panta* curbei doză-răspuns în orice punct în termeni de concentrația locurilor de legare și a hormonului și de constanta de echilibru a reacției.

Combinînd expresiile rezultate pentru eroarea totală și pantă se poate obține o estimare a lui $\Delta's$ pentru orice valoare a oricăror parametri care guvernează analiza: concentrația locurilor de legare, constanta de echilibru, activitatea specifică a trasorului, volumul de incubare etc.

Apoi, prin diferențierea parțială a expresiei rezultată pentru $\Delta's$ în termeni de locuri de legare și de concentrația trasorului pot fi deduse valorile optime ale acestora în scopul de a diminua pe $\Delta's$ și de a maximaliza sensibilitatea sistemului.

Se consideră cazul cel mai simplu în care singura sursă de eroare a variabilei de răspuns este eroarea de măsurare a radioactivității în condițiile în care se presupune ca eficientă numai o singură specie de locuri de legare la concentrația mică de antigen (predomină produsul Kp) și că, în sistem trasorul este identic cu substanța nemarcată. În acest caz, se notează cu A_s activitatea specifică a substanței marcate dată în impulsuri/minut/unitatea de greutate, cu V volumul amestecului de reacție dat în mililitri și R_0f/b raportul distribuției radioactivității în punctul zero. Notînd cu $*s$ concentrația trasorului în amestecul de incubare și cu b_0 și f_0 activitățile legată și liberă în punctul zero (R_0f/b), avem:

$$b_0 = \frac{*sA_sV}{R_0f/b + 1} \qquad (4.17)$$

și

$$f_0 = \frac{{}^*sA_sVR_0f/b}{R_0f/b+1} \tag{4.18}$$

Citind aceste două fracțiuni (b_0 și f_0) un timp T suficient pentru a diminua eroarea relativă a raportului f/b, se observă că

$$\frac{\Delta R_0f/b}{R_0f/b} = (1+\sqrt{R_0f/b})\sqrt{\frac{R_0f/b+1}{{}^*sA_sVTR_0f/b}}, \tag{4.19}$$

unde $\Delta R_0f/b$ este deviația standard a determinării lui R_0f/b.

Diferențiind ecuația (4.9), luînd K și p constante

$$\frac{\mathrm{d}Rf/b}{\mathrm{d}s\cdot Rf/b} = \frac{1}{pRf/b+(1/Rf/b)} \tag{4.20}$$

pentru oricare valori ale lui Rf/b.

Schimbînd notațiile pentru concentrații hormonale mici și combinînd ecuațiile s-a ajuns la ecuația

$$\Delta's\sqrt{A_sVT} = (1-\sqrt{R_0f/b})\,(pR_0f/b) + \frac{K}{KR_0f/b}\sqrt{\frac{K}{(KR_0f/b-1)}}, \tag{4.21}$$

care dă modificarea minimă detectabilă a concentrației substanței de dozat pentru orice valoare a lui p și implicit a lui $*s$.

Pentru a selecționa concentrația optimă a lui p și $*s$ în așa fel încît $\Delta's$ să fie minim, se calculează diferențialele parțiale $\frac{\delta(\Delta's)}{p} = 0$ și $\frac{\delta(\Delta's)}{\delta R_0f/b} = 0$, rezultînd de aici că

$$p = \frac{3}{K}, \tag{4.22}$$

$$s^* = \frac{4}{K} \tag{4.23}$$

iar

$$R_0f/b = 1. \tag{4.24}$$

Introducînd aceste valori în ecuația (4.21) se poate calcula

$$\Delta's = \frac{4\sqrt{2}}{\sqrt{KA_sVT}}, \tag{4.25}$$

Din ecuațiile (4.17) — (4.25) au fost deduse o serie de concluzii practice [19]: sensibilitatea sistemului este maximă cînd raportul R_0f/b sau b/f) este egal cu unu; concentrația substanței marcate și a proteinei de legare sînt independente de activitatea specifică a trasorului; concentrația minimă detectabilă a substanței de dozat este invers proporțională

cu rădăcina pătrată a activității specifice a trasorului, a constantei de echilibru a reacției, a volumului de incubare a amestecului și a timpului de citire pentru fracțiunile legată și liberă.

Aceste concluzii deși sînt aplicabile numai cînd orice alte erori, în afara erorii de măsurare, sînt egale cu zero, condiție care nu corespunde realității, ele servesc drept ghid teoretic pentru asigurarea sensibilității maxime.

Analiza unui exemplu numeric [19] a generat unele corecții ale ecuațiilor prezentate. Se ia $A_s = 250$ μCi/μg insulină ($GM \sim 6000$) marcată cu ^{131}I, măsurarea se face cu un contor cu 45% eficiență obținîndu-se 250 imp/min/ng — amestecul de reacție în volum de 100 μl este supus separării prin cromatoelectroforeză și fracțiunile legată și liberă sînt citite cîte 10 minute. Deci

$$A_s VT = 250 \times 0{,}1 \times 10 = 250 \text{ ml/ng}.$$

Un ser anti-insulină tipic are constanta de echilibru $K = 10^{11}$ l/mol sau $K = \frac{1}{60}$ ml/ng, deci concentrația minimă detectabilă a insulinei în amestecul de reacție este

$$\Delta' p = \frac{4\sqrt{2}}{\sqrt{K A_s VT}} = \frac{4\sqrt{2}}{\sqrt{1/60 - 250}} \simeq 2{,}8 \text{ ng/ml}.$$

Dacă simplitatea acestui mod de calcul rezistă la estimarea cantității minime detectabile, calculul concentrației reactivilor dă valori excesiv de mari pentru trasor:

$$^*s = \frac{4}{K} = \frac{4}{1/60} = 4 \cdot 60 \text{ ng/ml} = 240 \text{ ng/ml},$$

iar

$$p = \frac{3}{K} = 3 \cdot 60 \text{ ng/ml} = 180 \text{ ng/ml}.$$

Introducînd însă în calcul și erorile experimentale, acest procedeu se validează. Se notează cu ΔR_0 eroarea (relativă) minimă experimentală la determinarea lui R cînd R este egal cu unu și se presupune că sensibilitatea este maximă tot cînd R este unu. Rezultă că eroarea relativă totală în $R_0 f/b$ este dată de

$$\frac{\Delta R_0 f/b}{R_0 f/b} = \sqrt{\frac{R_0 f/b + 1}{R_0 f/b \, {}^*s A_s VT} (1 + \sqrt{R_0 f/b})^2 + \varepsilon^2}. \tag{4.26}$$

Derivînd, diferențiind și notînd $R_0 f/b = 1$, $\Delta' s$ este dată de

$$\varepsilon^2 A_s VT \left(p - \frac{1}{K}\right)^2 + 2\left(p - \frac{1}{K}\right) - \frac{4}{K} = 0. \tag{4.27}$$

Scanned with OKEN Scanner

Ecuaţia (4.27) arată relaţia concentraţiei optime a locurilor de legare * (şi de aceea şi a trasorului) cu $\varepsilon \sqrt{A_s VT/K}$, care la reprezentarea grafică [19] arată că indiferent de valorile lui $A_s VT$ şi K, Kp tinde către 3 şi K^*s către 4.

Dacă erorile experimentale nu sînt zero, crescînd activitatea specifică scade cantitatea de trasor din sistem ceea ce se poate deduce şi intuitiv. Şi totuşi, pentru orice valori finite ale lui ε şi A_s există sigur o cantitate optimă de trasor care poate fi introdusă într-un sistem de analiză [19].

Cinetica sistemelor de analiză cu radioliganzi. Există multe analogii între cinetica reacţiilor enzimatice şi cinetica sistemelor de analiză cu radioliganzi, cu toate acestea studiile asupra cineticii reacţiilor în care o enzimă reacţionează cu un substrat şi un inhibitor sau cu două substrate [84—87], nu pot fi transferate direct sistemelor cu radioliganzi. Diferenţa principală între cele două categorii de reacţii ţine de variabila de răspuns care într-un caz este rata reacţiei (concentraţia complexului enzimă-substrat) şi în alt caz este un raport (B/F, F/B etc.) [76].

Berson şi Yalow [70] au elaborat teoria matematică a *echilibrului* sistemelor RIA pentru diferite situaţii, de exemplu : constante de afinitate de un singur ordin (şi antigenul şi anticorpul sînt omogene şi monovalente) antigenul este bivalent şi anticorpul este monovalent, sau antigenul este monovalent şi reacţionează cu anticorpul care conţine două „ordine" de situsuri de combinare. Consideraţiile acestor autori asupra stărilor intermediare, tranzitorii (cinetica) reacţiilor RIA se referă la reacţia dintre antigenul monovalent cu două ordine de situsuri de combinare ale anticorpului. Analiza cinetică se bazează pe premisa limitativă că concentraţia antigenului radioactiv este infinitesimală (tinde către zero) în comparaţie cu cea a anticorpului, ceea ce ar corespunde cu un sistem cu exces de anticorp. Adaptarea acestei premise face posibilă reducerea ecuaţiilor diferenţiale neliniare reale la ecuaţii diferenţiale reale permiţînd o soluţie analitică. În realitate, în sistemele RIA şi, în general, în sistemele cu radioliganzi, cantităţile de antigen şi de anticorp sînt comparabile [6, 19].

Independent, Ekins [6, 19] dezvoltă teoria matematică a sistemelor RIA şi competitive la echilibru în mai multe situaţii : a) cantitatea de antigen marcat şi de anticorp sînt de acelaşi ordin de mărime, b) un antigen monovalent reacţionează cu orice număr$^{(n)}$ de anticorpi monovalenţi cu n constante de afinitate diferite şi, c) constanta de afinitate a antigenului marcat este diferită de a celui nemarcat, în plus, analizează relaţia dintre erorile experimentale şi de măsurare precum şi forma curbei doză-răspuns.

Au fost publicate studii asupra *cineticii* reacţiilor competitive şi simularea pe computer a cineticii reacţiilor tiroxinei şi triiodotironinei cu trei proteine de legare [88] şi asupra cazului particular al separării cu dublu anticorp [89].

Analiza teoretică a *cineticii* sistemelor RIA imunoradiometrice [90] şi radioreceptoare [91, 92] elaborată de Rodbard şi colab. [78, 79] pleacă de la cazul restrictiv al monovalenţei antigenului şi anticorpului, care reacţionează conform legii acţiunii maselor de ordinul I (cinetică chimică de ordinul II). Ecuaţiile diferenţiale neliniare de ordinul I şi ecuaţiile de conservare a masei rezultate au soluţii numerice care permit să se prevadă performanţele curbei standard în funcţie de timpul de incubare în o serie de

---

* Concentraţia locurilor de legare este exprimată în termeni de concentraţia hormonului pe care acele locuri îl leagă.

situaţii delimitate. De exemplu, cînd toţi reactivii sînt adăugaţi simultan, cea mai bună sensibilitate şi precizie se obţin la echilibru (reacţie competitivă), iar cînd antigenul marcat este adăugat tardiv (reacţie de deplasare) sensibilitatea este mai bună dacă întrerupem reacţia înainte de echilibru ; dimpotrivă, sensibilitatea şi precizia scad brutal cînd substanţa nemarcată este adăugată tardiv.

Previziunile teoretice asupra performanţelor curbei standard în diferite condiţii, rezultate din calculele prin simulare pe calculator prezintă unele discrepanţe faţă de rezultatele experimentale. Discrepanţele izvorăsc din dificultăţi ale tehnicii de separare, din legarea nespecifică, din instabilitatea cu temperatura poate prin intervenţia enzimelor. Dacă în aceste neconcordanţe sînt implicate şi modificări ale conformaţiei, ale structurii cuaternare adică efecte alosterice, atunci analiza cineticii RIA trebuie completată cu analiza cineticii efectelor alosterice [86, 87, 90, 93].

Simularea la calculator mai permite şi alegerea valorilor optime pentru substanţa marcată, pentru proteina de legare şi pentru timpul de incubare şi selecţia, din combinarea acestor valori, a combinaţiei care oferă cea mai bună sensibilitate şi precizie [79].

4.3.8. AUTOMATIZAREA SISTEMELOR DE ANALIZĂ CU RADIOLIGANZI

Scopul metodelor de radioimunoanaliză şi al celor înrudite este să măsoare o cantitate necunoscută de substanţă în minimum de timp, cu sensibilitate, exactitate şi precizie maximă, fără posibilităţi de măsluire.

Numărul mare de factori care intervin într-un sistem de analiză şi interacţiunile lor [94], multiplele surse de eroare în cursul manevrelor de dozare, creşterea vertiginoasă a numărului substanţelor care se măsoară cu aceste metode şi cererea în continuă creştere pentru analize cu radioliganzi au impus studiul posibilităţilor de realizare a unor instalaţii care să asigure automatizarea parţială sau totală a procedurilor.

Aspecte teoretice. Automatizarea este un termen derivat din limbajul cibernetic şi implică conceptele de control, prin feedback (retrocontrol), şi de reglare. De aceea un sistem de analiză automat reprezintă mult mai mult decît o maşină de pipetare, el trebuie să realizeze proiectarea unui sistem de analiză, să asigure execuţia mecanică, să efectueze prelucrarea datelor brute, analiza statistică a lor şi controlul calităţii [75] (fig. 4.9).

Partea cea mai importantă este realizarea unui program (software) pentru computer, cu ajutorul căruia să poată fi realizată proiectarea adecvată a sistemului de analiză. Aspectele teoretice care stau la baza unui astfel de program sînt utile mai ales pentru realizarea unui echipament automatizat dar şi pentru sisteme simple, neautomatizate.

Proiectarea unui sistem de analiză este elementul-cheie al schemei unui sistem automatizat, iar problema principală a proiectării este selecţionarea unui sistem optimal de analiză în ceea ce priveşte : concentraţia reactivilor, timpul de incubare şi de măsurare a probei, pentru a obţine sensibilitate şi precizie maximă [75]. De aceea, în sistemele de calcul sînt luaţi în considerare factorii care pot influenţa precizia, factori care acţionează, şi individual dar mai ales prin interacţiunea dintre ei. Între factorii prezentaţi în tabela 4.7 şi figura 4.10, constanta de echilibru (K) şi concentraţia reactivilor sînt în esenţă ficşi, pe cînd timpii de

incubare şi de măsurare a radioreactivităţii sînt prestabiliţi de experimentator [75].

Selectarea *concentraţiei reactivilor* pe baze numai intuitive poate duce la proiectarea unor sisteme de analiză suboptimale, de aceea au fost emise unele premise teoretice pentru o selecţie adecvată a lor (vezi § 4.3.8). Stabilirea concentraţiei reactivilor — a trasorului şi a proteinei de legare —

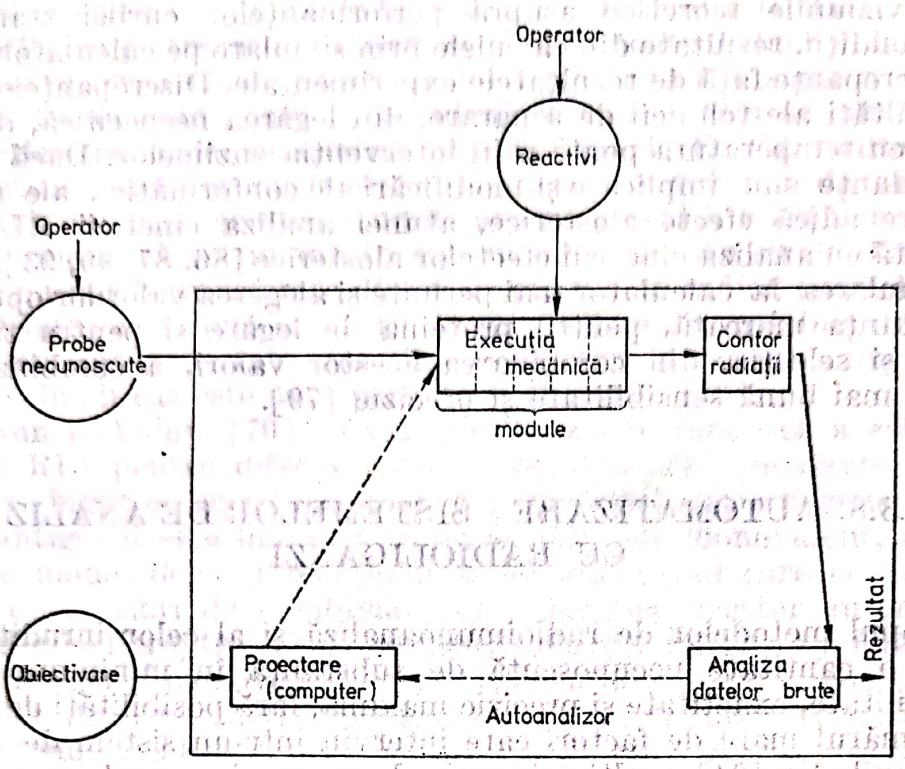


Fig. 4.9. — Elementele principale ale unui analizor autoreglabil complet automatizat, modificat după ref. [75]. În sistemele *parţial* automatizate, executantul intervine în una sau mai multe faze ale execuţiei mecanice, de exemplu pentru centrifugare.

astfel încît să se obţină *sensibilitate* maximă pune dificile probleme teoretice. Pornind de la legea acţiunii maselor, au fost derivate o serie de expresii algebrice care definesc concentraţia optimă a reactivilor pentru realizarea sensibilităţii maxime în dozare [6, 19]. Astfel de relaţii algebrice

TABELA 4.7

Factorii care pot influenţa precizia unui sistem de analiză cu radioliganzi [75]

Factori		Surse
globali	grupaţi	
Eroarea totală	eroarea experimentală	pipetare şi alte manevre confuzie compartiment liber şi legat impurităţi în reactivi concentraţia reactivilor
	eroarea de măsurare	activitatea specifică a trasorului timp de citire per probă volumul amestecului de incubare concentraţia reactivilor
	panta curbei doză-răspuns	constanta de echilibru concentraţia reactivilor

pleacă însă de la unele premise simplificatoare privind în special relaţia dintre eroarea experimentală şi metamerul de răspuns al curbei doză-răspuns. Obstacolele principale în calea alegerii unui model matematic adecvat sînt neliniaritatea curbei doză-răspuns şi repartiţia neuniformă a erorii de-a lungul curbei, eroarea fiind corelată cu cantitatea de substanţă care se măsoară.

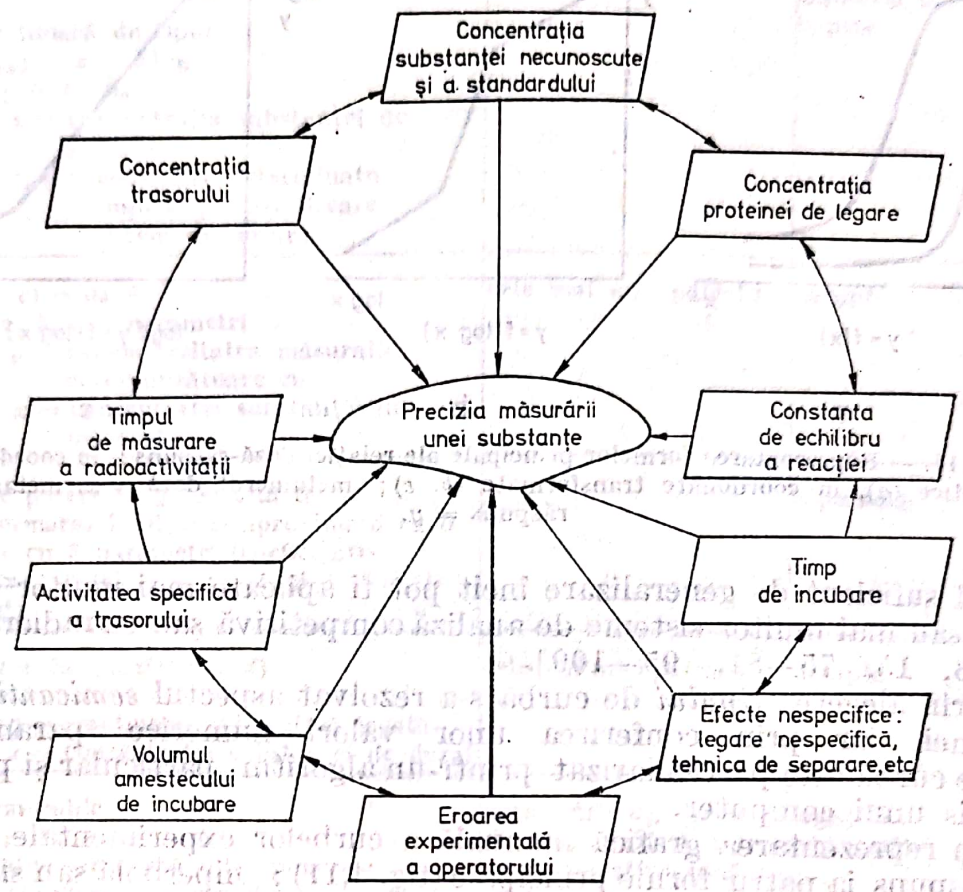


Fig. 4.10. — Interacţiunile factorilor luaţi în considerare în proiectarea unui sistem cu precizie optimă: din combinarea adecvată a lor rezultă precizia maximă (modificat după ref. [75]).

Există sisteme de dozare (antigen, anticorp impure etc.) pentru care aceste premise nu-şi menţin validitatea şi de aceea generalizarea expresiilor algebrice prezintă unele restricţii, care necesită analiza pe baza acestor formule a fiecărui sistem în parte. Soluţiile problemelor particulare fiecărui sistem nu pot fi obţinute decît folosind calculul programat la un computer, adoptînd metode numerice. Aceasta înseamnă, în esenţă, construirea unui *model matematic* al întregului sistem de dozare, care să încorporeze *ecuaţiile curbei doză*-răspuns.

Modelele matematice sînt deci de două feluri: bazate pe raţionament, adică cele care pornesc de la mecanismul reacţiei antigen-anticorp aproximat prin legea acţiunii maselor, şi cele empirice rezultate din analiza unui număr suficient de mare de date experimentale. Relaţia dedusă din aplicarea mecanismului de interacţiune dintre antigen şi anticorp, considerate univalente, a dus la construirea reprezentărilor Scatchard [82], utile pentru a determina constanta de echilibru şi pentru a sesiza neomogenitatea populaţiei anticorpilor prin schimbarea bruscă a pantei doză-răspuns. În realitate însă, majoritatea antiserurilor folosite în practică, deşi ne-

omogene sînt totuşi utile dozărilor ; de aceea s-a recurs la modelul empiric care constă din alegerea unui tip de curbă exprimată matematic printr-o funcţie empirică aleasă prin ajustarea din aproape în aproape a datelor experimentale pînă cînd se obţine expresia grafică (respectiv analitică), care satisface un anumit sistem de dozare. Dar aceste funcţii pot prezenta

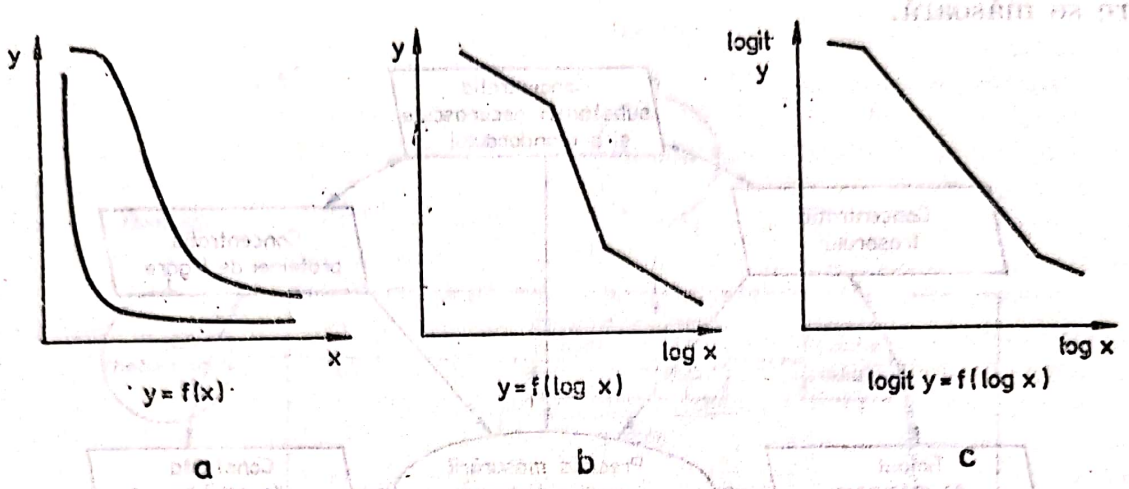


Fig. 4.11. — Reprezentarea formelor principale ale relaţiei doză-răspuns : în coordonate aritmetice (*a*), în coordonate transformate (*b*, *c*) ; metamerul doză = *x*, metamerul răspuns = *y*.

un grad suficient de generalizare încît pot fi aplicate mai multor sisteme RIA şi/sau mai multor sisteme de analiză competitivă sau cu radioreceptor [12, 13, 15, 75—81, 95—109].

Prin alegerea *tipului* de curbă s-a rezolvat aspectul *semicantitativ* al problemei, iar prin conferirea unor valori numerice parametrilor tipul de curbă este particularizat printr-un algoritm particular şi poate fi transmis unui computer.

În reprezentarea grafică manuală a curbelor experimentale, relaţia doză-răspuns ia patru forme principale (fig. 4.11) ; hiperbolă sau sigmoidă în coordonate aritmetice, dreaptă sau dreaptă sigmoidă la capete în coordonate transformate.

Expresiile matematice care aproximează suficient de adecvat aceste tipuri de curbe sînt deduse matematic (fineware) şi alcătuiesc baza *rutinelor* pentru calculatorul electronic (tabela 4.8).

Practica arată că influenţe nestăpînite pot aduce valori „deşuchiate", care sar mult dincolo sau dincoace de „cal" (calul fiind curba care trece prin majoritatea punctelor) ; pentru eliminarea lor sînt folosite expresii algebrice transformate în *subrutine*. Tot ca subrutine sînt incluse algoritmurile care permit „disecţia" erorilor (tabela 4.8) şi care analizează interacţiunea surselor de eroare (fig. 4.10). Alte subrutine calculează parametrii statistici pentru estimarea liniarităţii (de exemplu valoarea F), a limitelor de confidenţă şi a paralelismului curbelor. Valorile necunoscutelor sînt calculate din ecuaţia tipului de curbă stabilit cu valori numerice ale parametrilor care dau cea mai bună potrivire cu datele experimentale. Programe adiţionale stabilesc condiţiile pentru sensibilitate optimă, sau calculează reprezentarea Scatchard pentru determinarea omogenităţii sau eterogenităţii proteinei de legare.

Orice alte rutine adiţionale pot fi incluse în programul general, de exemplu pentru disecţia aspectelor cinetice [71, 74, 79, 112] sau de termodinamică [113].

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 4.8

Funcţii analitice pentru aproximarea curbei standard

Funcţia	Metoda de ajustare	Forma curbei	Bibliografie
logit $y = \log_e\left(\frac{y}{1-y}\right)$ relaţie liniară de tipul logit $(y) = a + b \log x$ unde $y = B_i/B_0$ x = concentraţia substanţei de măsurat a, b = constante determinate empiric pentru fiecare sistem de dozare	cele mai mici pătrate	dreaptă sau dreaptă şi sigmoidă la capete	[15]
$1/(y + c) = ax + b$ unde a, b, c = parametri y = radioactivitatea măsurată corespunzătoare cu x = concentraţia substanţei de măsurat	cele mai mici pătrate	dreaptă	[15]
funcţie putere în y (pornită de la transformarea logit/log) aproximată ca o ecuaţie cu 5 parametri (coeficienţi) $x_5(y) \simeq (1/y)(C_0 + C_1y + C_2y^2 + C_3y^3 + C_4y^4)$		hiperbolă	[96]
$y = (a + bx + cx^2)/(x + d)$ unde y = fracţiunea radioactivă legată x = concentraţia substanţei de dozat	cele mai mici pătrate	dreaptă	[75] [100]
Polinom cubic $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ Segmentele de curbă între punctele curbei standard sînt descrise de funcţia $f(x) = a_i + b_i(x - x_i) + c_i(x - x_i)^2 + d_i(x - x_i)^3$	parametrii a_i, b_i, c_i şi d_i sînt variaţi într-o pantă iterativă pînă ce segmentele curbei (derivata a doua) sînt continue la capete, adică urmăreşte continuitatea întregii funcţii de racordare şi a derivatei de ordinul întîi	logistică (sigmoidă)	[105] [106] [107] [110] [111]

Sisteme de execuţie automată a procedeelor de analiză cu radioliganzi. De la prima dozare a insulinei în anul 1959 pînă astăzi, numărul substanţelor măsurate prin metode cu radioliganzi trece de 500 [113]. Programele naţionale de sănătate solicită efectuarea dozării unor hormoni şi substanţe nehormonale în mod sistematic. Cîteva exemple sînt ilustrative: antigenul Australia la donatorii de sînge, HPL de cel puţin 5 ori în cursul unei sarcini, renina şi aldosterona ca screening pentru hipertensiune, α-fetoproteina în sîngele matern şi în lichidul amniotic pentru detectarea prenatală a spinei bifida şi a anencefaliei, TSH şi T4 pentru investigaţia tiroidei [113].

Metodele de automatizare cu flux continuu folosite în chimia clinică pentru procedeele colorimetrice sînt adaptabile, în principiu, şi metodelor cu radioliganzi, deşi acestea prezintă unele obstacole. Dificultăţile practice

principale constau în decizia pentru sisteme la echilibru sau neechilibrate cu implicații în stabilirea timpilor de incubare și a ordinii de adăugare a reactivilor precum și în adaptarea sistemelor mecanice la diversitatea tehnicilor de separare.

Sistemele RIA sînt sisteme „la echilibru" cînd reactivii sînt adăugați simultan la începutul fazei de incubare și reacția este întreruptă numai după atingerea completă a echilibrului. Sistemele „disechilibrate" sau „neechilibrate" sînt sisteme în care reactivii sînt adăugați succesiv, obișnuit trasorul este adăugat după o fază de preincubare a antiserului cu hormonul rece. Prin sisteme „cvasiechilibrate" se înțelege că reactivii sînt adăugați simultan dar reacția este întreruptă înainte de atingerea echilibrului [75]. Scurtînd timpul de incubare, sensibilitatea și precizia scad dar scăderea este mai puțin accentuată în sistemele neechilibrate decît în cele cvasiechilibrate. Într-un sistem de dozare automată optimizat, timpul de incubare este astfel ales încît sensibilitatea și precizia să fie acceptabile pentru un minimum de interval de incubare [75]. Ținînd seama că concentrația în lichidele biologice a substanțelor de analizat variază în limite foarte largi, de exemplu de la picograme (10^{-12}g) TSH, la micrograme (10^{-6}g) pentru HPL în cursul ultimului trimestru al sarcinii, rezultă clar că concentrațiile mari permit intervale de incubare scurte, de exemplu 15 minute pentru HPL. Scurtarea timpului de incubare în sistemele neechilibrate reduce legarea în punctul zero al curbei standard, compensabilă prin folosirea trasorului cu activitate specifică mare. Incubarea la temperatură crescută de exemplu la 37°C, permite reduceri, substanțiale ale timpului de incubare dar cu inconvenientul reducerii simultane a sensibilității prin reducerea constantei de echilibru [113].

Sistemele de dozare care necesită intervale de incubare lungi se efectuează cu sistemele autoanalizoare cu flux continuu, cu ajutorul unor serpentine de incubare lungi, care au inconvenientul suprapunerii reactivilor cu contaminare secvențială (efectul „carry-over"). De aceea, în aceste situații se recurge la pipetarea intermitentă a reactivilor sau la sisteme autoanalizoare parțial automatizate, care implică intervenția operatorului pentru sustragerea stativelor și incubarea lor separată de aparat.

Deși la debutul automatizării sistemelor RIA și competitive în anul 1966 [115], tehnica de separare a generat numeroase dificultăți în realizarea dispozitivelor efectoare, astăzi există sisteme automatizate capabile să rezolve una sau mai multe categorii de tehnici de separare [75, 107, 114, 116—122].

Insuficient rezolvată este problema automatizării sistemelor de analiză cu radioliganzi pentru hormonii steroizi, dificultățile fiind generate de procedeele de extracție a probelor înainte de dozare, deși pentru metodele chimice există sisteme cu grad important de automatizare [123].

Organizarea analizelor efectuate în sisteme automatizate prevede o intrare a datelor, prelucrarea lor la calculator și o ieșire cu rezultatele și analiza statistică a sistemului de analiză. Datele de intrare se referă la timpul de dozare, scopul (determinarea concentrației unei substanțe), diluentul, antiserul, trasorul, tehnica de separare, timp de incubare, standard, necunoscute etc. [78, 97, 102, 103, 107]. Protocolul programat asigură baza organizatorică a efectuării analizei în cursul întregului proces de la intrarea probelor în aparat pînă la ieșirea rezultatelor. Rezultatele

Scanned with OKEN Scanner

sînt înscrise clar sub forma unor buletine, iar informaţiile relevante sînt stocate în calculator.

Sistemele de analiză complet automatizate nu sînt accesibile decît centrelor mari unde sînt în adevăr utile. Totuşi, avalanşa de cereri pentru radioanalize impune unele măsuri de automatizare şi în laboratoare mai mici, de aceea organizarea efectuării analizelor prevede automatizări parţiale, care privesc unele faze ale procesului de lucru (tabela 4.9).

TABELA 4.9

Modalităţi de efectuare a analizelor cu radioliganzi

Procedeul	Modul de efectuare
Pipetare	manual, cu pipete automate parţial automat (cu dilutoare) complet automat : la autoanalizor
Incubare	manual parţial automat la autoanalizor intermitent complet automat la autoanalizor continuu
Separare	manual parţial automat prin scoatere din autoanalizor complet automat
Radiometrie	manual, la contor manual parţial automat la contor cu schimbător automat complet automat la contor inclus în modulele autoanalizorului
Înscrierea curbelor	manual — grafic parţial automat — prin calcul la calculator electronic complet automat la calculator electronic inclus în modulele autoanalizorului
Proiectarea unui nou sistem de analiză	experimental parţial automat — la calculator electronic complet automat prin program inclus în memoria calculatorului din autoanalizor
Optimizarea sistemului de analiză	experimental şi intuitiv parţial automat la calculator complet automat prin program inclus în memoria calculatorului din autoanalizor

Beneficiile sistemelor automatizate nu sînt însă neglijabile. Exceptînd reducerea mîinii de lucru şi a gradului de calificare, sporul principal se realizează în precizia care este sub 3% [114] faţă de 10—20% în determinările manuale, iar numărul analizelor se ridică la o medie de peste 5000 pe săptămînă pentru aproximativ 10 hormoni [105, 106], faţă de 500 de determinări pentru cel mult 5 hormoni cît poate efectua o persoană calificată lucrînd cu tehnici manuale.

BIBLIOGRAFIE

1. „WHO Expert Commitee on Biological Standardization", Technical Raport Series 565, WHO, Geneva, 1975.
2. T. Munkner, în „IAEA, Research Co-ordination meeting on *in vitro* procedures and techniques", London, 29 noembrie — 3 decembrie 1976.

Scanned with OKEN Scanner

3. „Radioimmunoassay of hormones for clinical trials of fertility regulating agents in developing countries", Technical Raport Series 578, WHO, Geneva, 1975.
4. Standardization of Radioimmunoassay Procedures, *Internat. J. Appl. Radiation Isotopes*, **25**, 145 (1974).
5. R.S. Yalow, S.A. Berson, în „*In vitro* Procedures with radioisotopes in medicine", IAEA, Vienna, 1970, p. 455.
6. R.P. Ekins, G.B. Newman, în „Protein and Polypeptide Hormones" editat de M. Margoulies, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1969, p. 329.
7. S.R. Vivian, F.S. La Bella, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **33**, 225 (1971).
8. A.R. Midgley, G.D. Niswender, R.W. Rebar, *Acta endocr., Suppl.* **142**, 163 (1969).
9. J. Albano, R.P.Ekins, în „*In vitro* procedures with radioisotopes in medicine", IAEA, Vienna, 1970, 491.
10. D. Rodbard, J.A. Cooper, în „*In vitro* procedures with radioisotopes in medicine", IAEA, Vienna, 1970, p. 659.
11. I. Marschner, în „IAEA, Research Co-ordination meeting on *in vitro* procedures and techniques", London, 29 noiembrie — 3 decembrie 1976.
12. I. Marschner, R. Herndl, în „IAEA, Research Co-ordination meeting on *in vitro* procedures and techniques", London, 29 noiembrie — 3 decembrie 1976.
13. D. Rodbard, P.L. Rayford, J. Cooper, G.T. Ross, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 352 (1968).
14. M. Coculescu, M. Oprescu, D. Ioanițiu, V. Matulevicius, în „Proc. Symp. Int. Soc. Psychoneuroendocrinology", Vișegrad, Publ. House Hung. Acad. Sci., 1975, p. 233.
15. D. Rodbard, W. Bridson, P.L. Rayford, *J. Lab. Clin. Med.*, **74**, 770 (1969).
16. R.S. Yalow, K. Hall, R. Luft, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **41**, 638 (1975).
17. D.J. Finney, „Statistical Method in Biological Assay", Hafner, New York, 1964.
18. C.I. Bliss, „The Statistics of Bioassay", Academic Press, New York, 1952.
19. R.P. Ekins, G.B. Newman, J.L.H. O'riordan, în „Radioisotopes in medicina : in vitro studies", editat de R.L. Hayes, F.A. Goswitz,) U.S. Atomic Energy Commission Division of Technical Information, Oak Ridge, Tenn., 1968, p. 59.
20. R.P. Ekins, G.B. Newman, R. Piyasena, P. Banks, J.D.H. Slater, *J. Steroid Biochem.*, **3**, 289 (1972).
21. R.P. Ekins, *Brit. Med. Bull.*, **30**, 3 (1974).
22. R.S. Yalow, S.A. Berson, în „Principles of competitive proteinbinding assays", editat de W.D. Odell și W.H. Daughaday, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, p. 374.
23. L.H. Rees, *J. Endocr.*, **67**, 143 (1975).
24. L.H. Rees, *Clinical Endocrinology*, **5**, Suppl., 363 s (1976).
25. L. Simionescu, *St. Cerc. Endocrinol.*, **23**, 143 (1972).
26. S.M. Milcu, L. Simionescu, V. Sahleanu, *Arch. U.M.B.*, **10**, 556 (1972).
27. Z. Laron, A. Pertzelan, M. Karp, *Israel J. Med. Sci.*, **4**, 883 (1968).
28. R.S. Yalow, K. Hall, R. Luft, *J. Clin. Invest.*, **55**, 127 (1975).
29. A.H. Rubenstein, F. Melani, D.F. Steiner, în „Methods in investigative and diagnostic Endocrinology", editat de S.A. Berson și R.S. Yalow, North-Holl. Publ. Co., Amsterdam, 1973, p. 870.
30. R.S. Yalow, S.A. Berson, *Metabolism*, **22**, 703 (1973).
31. R.S. Yalow, *Israel J. Med. Sci.*, **10**, 1185 (1974).
32. L.F. Ayvazian, B. Schneider, G. Gewirtz, R.S. Yalow, *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **111**, 279 (1975).
33. G. Gewirtz, R.S. Yalow, *J. Clin. Invest.*, **53**, 1022 (1974).
34. R.S. Yalow, în „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Vienna, 1974, vol. I, p. 3.
35. M.L. Aubert, *J. Nucl. Biol. Med.*, **14**, 1 (1970).
36. A.R. Midgley Jr., G.D. Niswender, V.L. Gay, I.E. Reichert Jr., *Recent Progr. Horm. Res.*, **27**, 235 (1971).
37. A. Galskov, *Acta Endocrinol.*, **169**, Suppl. 162, 5 (1972).
38. C.N. Hales, P.J. Randle, *Biochem. J.*, **88**, 137 (1963).
39. E. Cerasi, L.D. Casa, R. Luft, *Acta Endocrinol.*, **53**, 101 (1966).
40. C. Faiman, R.J. Ryan, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **28**, 1076 (1968).
41. R.J. Ryan, C. Faiman, în „Proceedings, International Symposium on Proteins and Polypeptide Hormones", editat de M. Margoulies, Excerpta Medica, Amsterdam, 1969, p. 129.
42. W.D. Odell, L.E. Reichert, R.W. Bates, în „Proceedings, International Symposium on Protein and Polypeptide Hormones", editat de M. Margoulies, Excerpta Medica, Amsterdam, 1969, p. 124.
43. R.J. Ryan, *Acta Endocrinol.*, **63**, Suppl. 142, 300 (1969).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

METODE DE ANALIZĂ ÎNRUDITE CU METODELE RADIOIMUNOLOGICE

Începînd cu anul 1960 au fost dezvoltate încă trei mari categorii de analize care folosesc molecule marcate cu radioizotopi, metode care, deşi pornite de la măsurarea hormonilor, se extind vertiginos pe un larg registru al greutăţilor moleculare de la molecule gigante pînă la aminoacizi.

Metoda de analiză prin legare competitivă la o proteină plasmatică a fost descrisă aproape simultan [1] cu metoda radioimunologică şi se deosebeşte de aceasta prin folosirea, în locul anticorpului, a unei proteine naturale prezentă în plasma diferitelor specii. Un deceniu mai tîrziu se afirmă metode care înlocuiesc antigenul marcat cu anticorp marcat [2, 3]. La scurt timp, îşi fac loc metode în care proteina de legare este o moleculă cu rol fiziologic de receptor hormonal, izolată din organul ţintă al hormonului.

Din punctul de vedere al caracteristicilor de bază ale sistemelor de reacţie competitive, metoda prin legare competitivă la o proteină plasmatică este ruda cea mai apropiată cu sistemele RIA. Dar din punctul de vedere al naturii reacţiei, metoda imunoradiometrică prezintă o filiaţie încă mai strînsă cu sistemele radioimunologice originale.

5.1. METODE DE ANALIZĂ IMUNORADIOMETRICE

Sistemele RIA combină sensibilitatea pe care o oferă folosirea compuşilor marcaţi cu izotopi radioactivi cu specificitatea reacţiei de tip antigen-anticorp.

În reacţia dintre antigenul marcat, cel nemarcat şi anticorp,

$$^*Ag + Ac + Ag \rightleftharpoons {}^*AgAc + AgAc + {}^*Ag + Ag$$

cantitatea de complex AgAc format este estimată *indirect* prin efectul său de a reduce cantitatea de complex *AgAc.

Au fost semnalate unele dezavantaje teoretice şi practice ale cantificării substanţelor în sisteme RIA convenţionale :

— o proporţie variabilă şi deseori destul de mare de substanţă necunoscută rămîne necomplexată şi de aceea sensibilitatea scade ;

— conformaţia moleculară a unor hormoni polipeptidici apare distorsionată după iodurare, de exemplu, hormonul paratiroidian bovin [4] ;

— alteori nucleul tirozinic folosit pentru iodurare lipseşte din structura chimică a substanţei pe care o dozăm şi sînt necesare procedee elaborate pentru iodurarea unor derivaţi ai polipeptidei căreia i s-a introdus un nucleu tirozinic, de exemplu tirozilesterul peptidei-C a proinsulinei bovine [5] ;

— tirozina poate intra în structura chimică a unei porţiuni importante a zonei imunologic active şi de aceea plasarea unui atom

de iod pe nucleul său o poate elimina din reacţia antigen-anticorp, scăzînd sensibilitatea întregului sistem RIA ;

— pentru realizarea competiţiei dintre antigenul marcat şi cel nemarcat pentru situsurile de combinare ale anticorpului, concentraţia anticorpului trebuie să fie redusă pînă cînd leagă aproximativ jumătate (50%) din antigenul marcat în absenţa anticorpului. Deci, concentraţia anticorpului poate fi uneori mai mică decît suma concentraţiilor antigenului marcat şi nemarcat din sistem şi de aceea pentru a realiza condiţia unei sensibilităţi adecvate, este necesar ca anticorpul să fie dotat cu afinitate foarte bună ;

— curba standard obţinută cu sisteme RIA nu este liniară, fapt care limitează precizia măsurării unei substanţe.

Metoda imunoradiometrică introdusă de Miles în 1968 [2], se deosebeşte de sistemele RIA convenţionale prin aceea că măsurarea se face prin dozare într-un sistem în care substanţa (antigenul) pe care o dozăm se combină direct cu un anticorp marcat nemaifiind necesară o competiţie cu un antigen marcat :

$$Ag + {}^{*}Ac \rightleftharpoons Ag{}^{*}Ac$$

Uzual, pentru marcarea anticorpului este folosit ^{125}I sau ^{131}I [3, 6, 7].

5.2. METODE DE RADIOANALIZĂ PRIN LEGARE COMPETITIVĂ CU PROTEINE PLASMATICE

Principiul radioimunoanalizei este aplicat şi sistemelor neimunitare, în care reacţia dintre substanţa analizată şi proteina de legare nu este de tip antigen-anticorp. Primele substanţe măsurate cu aceste metode sînt tiroxina în anul 1960 [8], urmată la scurt timp de vitamina B_{12} [9] şi de cortizol [10].

Proteinele cu proprietăţi de legare specifice nu sînt proteine-anticorp (imunoglobuline) produse în mod artificial prin inocularea unui imunogen la un animal, ci sînt proteine naturale a căror capacitate de legare pentru substanţe biologic active era cunoscută de peste un deceniu. Ţinînd seama de aplicaţiile largi în clinica umană, au fost detectate şi caracterizate numeroase proteine plasmatice şi tisulare.

Proteinele naturale cu proprietatea de a lega specific substanţe biologic active sînt clasificate în două mari categorii : proteine plasmatice transportoare sau de tranzit şi proteine receptoare izolate din ţesuturi (organe, glande) ţintă. Corespunzător, metodele de analiză prin legare neimunitară a ligandului (o substanţă pe care o măsurăm) sînt metode în care se utilizează proteine plasmatice numite metode de analiză prin legare proteică competitivă (CPB sau CPBA = competitive protein binding assay) şi metode cu proteine receptoare sau metode radioreceptoare (RRA = radioreceptor analiză). Sistemele de analiză neimunitare au comun cu sistemele imunitare un trasor (substanţa marcată) şi un reactiv de legare (cu mare afinitate şi specificitate), de aceea s-a încercat însă fără rezultat, o unificare a termenilor pentru desemnarea lor [11].

Semnificaţia biologică a proteinelor de tranzit în circulaţia sanguină este puţin cunoscută. Se ştie că ele dau cont de fracţiunea legată a unui hormon (tiroidian, suprarenal sau gonadic), de aceea cantificarea lor, de exemplu prin tehnici radioimunologice [12], reprezintă o măsură indirectă a fracţiunii hormonale legate. Nu este suficient clarificată nici

Scanned with OKEN Scanner

creşterea timpului de înjumătăţire al hormonului în forma sa legată care este de ordinul zilelor faţă de hormonii fără transportor ca hormonii polipeptidici cu timpul de înjumătăţire de ordinul minutelor. Hormonii tiroidieni şi steroizii suprarenali şi gonadici sînt puţin solubili în mediu apos, de aceea se crede că proteinele transportoare au un rol în creşterea solubilităţii ligandului în sînge. Totuşi, de exemplu pentru hormonii tiroidieni există trei proteine transportoare ; dintre acestea, serumalbumina se află în concentraţie cu cîteva ordine de mărime mai mare decît a celorlalte două şi deci ar fi suficientă pentru a îndeplini rolul de mediator al solubilizării hormonului în lichidele circulante. Concentraţia acestor proteine de tranzit (tranzine) creşte în timpul sarcinii la toate speciile cu placentare hemocorială [13].

La majoritatea speciilor administrarea estrogenilor mimează creşterea tranzinelor observată în sarcină. S-a crezut mult timp că creşterea concentraţiei tranzinelor în timpul sarcinii ar avea un rol protector pentru hormonul liber dar s-a observat că în paralel, creşte şi concentraţia hormonului liber [14, 15]. În interpretarea rezultatelor se ţine seama de situaţiile patologice care perturbă sinteza tranzinelor în ficat (ciroza) sau eliminarea lor (nefrozele). Proteinelor transportoare li s-a atribuit un rol şi în reglarea cantităţii de hormon care pătrunde în celulă dar experienţele *in vitro* au arătat că spre dosebire de globuline care, adăugate mediului de cultură de ţesut reduc activitatea biologică a hormonilor, serumalbumina nu influenţează acest proces, probabil ca urmare a diferenţelor în valoarea constantei de asociere.

Activitatea biologică pare legată în primul rînd de cantitatea de hormon nelegată, această cantitate fiind determinată prin „feed-back" negativ indiferent de concentraţia proteinelor de legare din plasmă [16]. De aceea, creşterea sau scăderea concentraţiei proteinelor de legare în circulaţia sanguină nu pare să ducă la boli cu hiper- sau cu hipofuncţia unei glande.

Metodele radioanalitice de tip CBA au fost aplicate acelor hormoni pentru care au fost găsite proteine de legare şi anume : hormoni tiroidieni, corticosuprarenali şi gonadici (tabela 5.1).

TABELA 5.1

Substanţe dozabile în sisteme neimunitare cu proteine plasmatice ca reactivi de legare

Hormonul	Proteina de legare folosită
Hormoni tiroidieni : Tiroxina (T_4)	TBG : thyroxine binding globulin
Hormoni CSR : Cortizol	CBG : corticosteroid binding globulin
Corticosteronă	
11-Desoxicortizol	
11-Desoxicorticosteronă	
Cortizonă	
Hormoni gonadici :	SHBG : Sexual hormone binding globulin
Progesteronă	
17 α OH-Progesteronă	
Testosteronă	
Androstanolonă (5 α, 17 β OH)	
Androstandiol (5 α, 17 β OH)	
Androstendiol	
Estradiol	

Scanned with OKEN Scanner

Proteinele de legare prezintă unele caracteristici comune cu anticorpul și cu proteinele receptoare, iar performanțele metodelor CBA sînt comparabile în unele privințe cu ale metodelor RIA și cu radioreceptori (tabela 5.2). Cu toate acestea, unele simplificări esențiale oferite de RIA, în special în

TABELA 5.2

Aspecte comparative ale reactivilor de legare ai hormonilor

Criteriul	Proteine de legare		
	Artificiale	Naturale	
	Anticorpul	Tranzinele	Receptorii
Semnificația biologică a legării	informații asupra moleculei imunoreactive	stadiu ipotetic	informații asupra moleculei bioactive
Specificitatea interacțiunii cu ligandul	practic univocă, variații în limite restrînse	TBG : un hormon CBG și SBG : 2 sau mai mulți hormoni	intermediară
Sensibilitate	10^{-12} g	10^{-11} g	10^{-10} g
Precizie (cv %)	5—10	5—10	
Afinitate (K afin) pentru ligand	10^{11} — 10^{13} l/mol	10^{7} — 10^{10} l/mol la 4°C	10^{7} — 10^{11} l/mol la 4 °C
Titru	1 : 1 000 — 1 : 250 000	1 : 5 — 1 : 20 000	mici
Timp de echilibrare între trasor, ligand stabil și proteina de legare	ore-zile	secunde — minute	minute-ore
Stabilitate	congelare : ani ; variații în cadrul speciei și la același animal	congelare : ani ; +4°C : 3 săptămîni ; stabile în cadrul speciei	instabili congelare profundă 3—4 luni
Continuitate	diferențe între loturi	nu sînt diferențe în cadrul aceleiași specii	diferențe între loturi
Randament : probe/ml	10 000 — 2 500 000	50 — 200 000	50—100
Facilități de obținere	dificil pentru unele haptene (luni)	sîngerare, separare ser sau plasmă (minute)	tehnici relativ simple (ore)

ceea ce privește fazele preliminare de extracție și de purificare a probelor, fac ca metodele CBA să fie folosite numai dacă sistemele imunologice nu sînt disponibile [17].

5.3. METODA RADIORECEPTOARE

5.3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Cele trei categorii de metode : radioimunoanaliza cu varianta imunoradiometrică, legarea competitivă la proteine plasmatice și metoda radioreceptoare au comun o proteină de legare. Conceptual, procesul de legare

Scanned with OKEN Scanner

este o consecință a fenomenului recunoașterii specifice. Recunoașterea de tip anticorp este indusă într-un organism numai prin contactul cu partenerul antigenic, cea de tip proteină circulantă există și în absența substanței pe care o transportă deși cantitativ este influențată de ea, pe cînd în unele situații patologice proteinele receptoare (și întreg țesutul receptor) pot fi absente la apelul substanței în mod normal receptată.

Proteinele receptoare celulare au fost detectate cu ajutorul hormonilor marcați și clasificate „grosso modo" în : receptori ai suprafeței celulare, receptori solubili prezenți în citosol ; receptori nucleari.

Receptarea specifică a hormonilor polipeptidici are loc mai ales la nivelul membranei celulare, pe cînd hormonii steroizi pot pătrunde în celulă și sînt receptați și de proteinele intracelulare. De reținut că ipoteza interdicției hormonilor polipeptidici de a pătrunde în celulă începe să devină discutabilă cel puțin pentru prolactină [18].

Bazate pe recunoașterea structurii sterice a hormonilor, interacțiunile hormoni—proteine receptoare pot da cont de fenomenele de receptivitate la hormoni. Studiul acestor interacțiuni permite înțelegerea mecanismelor moleculare ale receptivității tisulare, ale agonismului, antagonismului și ale competiției hormonale.

Saturabilitatea și stereospecificitatea sînt caracteristici comune tuturor proteinelor de legare (anticorp, proteine naturale plasmatice sau tisulare), dar pentru proteina receptoare afinitatea este paralelă cu activitatea biologică a substanței active.

Din studiul interacțiunii substanței active cu receptorul sînt precizate caracteristicile proteinei receptoare ca număr de receptori (per celulă sau per unitate de greutate de proteină), afinitate, specificitate, viteză de legare și de disociere.

Analiza cantitativă în lichidele biologice a substanțelor biologic active prin metoda cu proteine receptoare furnizează informații similare celor oferite de RIA și CBPA și în plus, demonstrează eventuale alterări ale receptorilor asociate cu unele stări fiziologice sau cu unele boli la om sau la animal. Cercetările ultimilor ani arată că perspectivele deschise de aceste metode sînt încă mai vaste.

Se știe că hormonii sînt molecule informaționale și concentrația redusă a lor în lichidele biologice reclamă mecanisme de recunoaștere subtile, precise și cu localizări multiple. Hormonii, ca mesageri chimici, găsesc la nivelul celulelor-țintă mecanisme de recunoaștere pentru selecționarea lor de alte componente ale mediului interior. Mecanismele de recunoaștere implică situsuri de legare cu constante de afinitate foarte mari (de ordinul a 10^8—10^{10} l/mol), adecvate concentrației reduse a hormonilor în circulație, dotate cu funcția de stereospecificitate ca funcție primară [19]. Prin analogie, se poate afirma că și situsurile catalitice ale enzimelor prezintă specificitate, dar afinitatea lor pentru substrat este de 10^4 ori mai mică decît cea a situsurilor de legare a hormonilor pe receptori. Ordinul de mărime al afinității enzimelor este dictat de concentrația în general foarte mare a substratului (zaharuri, aminoacizi, lipide) metabolizat mai ales în scop energetic și suferind transformări chimice în cursul procesului de interacțiune cu enzima. În interacțiunea lor cu receptorul, hormonii nu sînt modificați chimic, în acest proces fiind implicate, se pare, fenomene fizice simple [19, 20].

Din punctul de vedere al categoriilor de substanțe biologic active analizate cu ajutorul proteinelor receptoare tisulare folosite ca proteine de legare în sistemele de dozare, se pot diferenția mai multe categorii de metode

Scanned with OKEN Scanner

radioreceptoare. Au fost investigate interacţiunile receptorului cu hormonii polipeptidici şi steroizi, cu prostaglandinele, nucleotidele ciclice, cu neurotransmiţători şi droguri (medicamente).

Metodele de analiză cu proteine receptoare deschid calea studiului detaliat al mecanismelor activităţii biologice folosind modele *in vitro* mult mai simple şi mai reproductibile decît metodele *in vivo* (fig. 5.1).

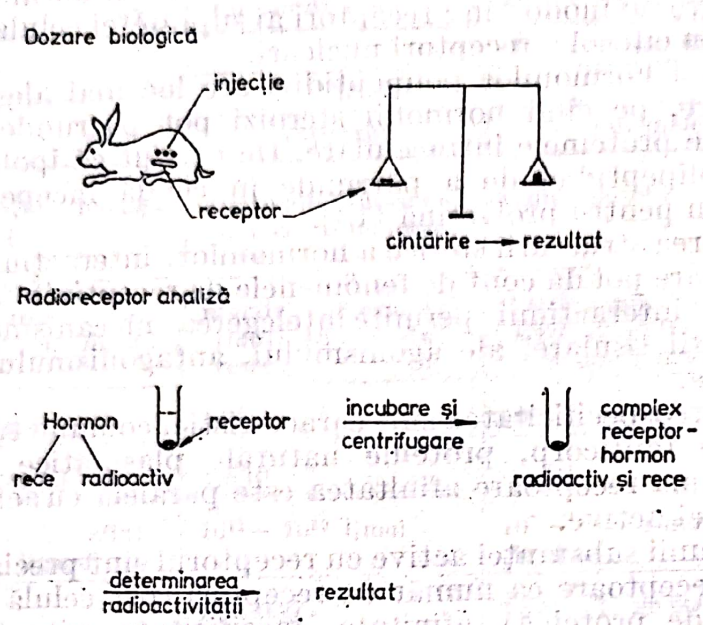


Fig. 5.1. — Reprezentare schematică comparativă a fazelor dozării biologice *in vivo* şi ale dozării radioreceptoare *in vitro* [165].

Termenul de „receptor" în accepţiunea uzuală include două proprietăţi: pe aceea de a *lega* hormonul în mod specific şi cu afinitate mare dar şi de a *activa* procese celulare. Aceste două funcţii ale receptorului sînt însă şi distincte şi disociabile. Astăzi, se înţelege prin receptor o proteină din ţesutul-ţintă dotată cu capacitate de legare specifică, cu afinitate mare deci cu funcţia de recunoaştere a unei substanţe biologic active. Această entitate este „necesară dar nu suficientă pentru a declanşa efectul hormonal" [22].

Principiul metodei radioreceptoare nu diferă întru nimic de cel al metodelor de analiză radioimunologică sau prin legare competitivă. Diferenţele apar în procesul de desfăşurare al analizei şi în semnificaţia rezultatelor obţinute. De exemplu, agentul de separare al radioactivităţii legate de cea liberă poate lipsi în cazul în care receptorul este folosit într-o formă insolubilă centrifugabilă cum sînt peletele de membrane plasmatice. Legarea radioactivităţii în prezenţa unui exces de receptor nu poate atinge valorile obţinute în metoda radioimunologică. De remarcat că diferenţele de legare între cele trei categorii de proteine discutate pot fi şi rezultatul blocării parţiale a situsurilor de legare cu hormonii endogeni. Dacă, de exemplu, în cazul anticorpului blocarea parţială cu hormoni endogeni este practic absentă, ea nu poate fi evitată ci cel mult diminuată în cazul proteinelor plasmatice şi al proteinelor receptoare tisulare.

Pînă în prezent, studiile asupra interacţiunii hormon-receptor au străbătut cinci etape principale: a) detectarea, cu ajutorul hormonilor marcaţi, a receptorilor specifici; b) stabilirea semnificaţiei fiziologice a receptorilor; c) dezvoltarea tehnicilor radioreceptoare şi aplicarea lor în clinica umană şi în cercetările experimentale; d) cantificarea receptoru-

lui în celulele ţintă ca un indice al sensibilităţii tisulare la hormoni în diferite boli şi e) prospectarea unor eventuale intervenţii terapeutice la nivelul receptorului.

Primele determinări cantitative directe au fost efectuate asupra hormonilor steroizi (estrogeni) [28] urmînd imediat hormonii polipeptidici [24].

5.3.2. RECEPTORII HORMONILOR POLIPEPTIDICI ŞI RADIORECEPTOR ANALIZA

Datele despre acţiunea hormonilor asupra ţesuturilor-ţintă obţinute cu ajutorul extractelor glandulare sau al hormonilor mai mult sau mai puţin purificaţi sînt rezultatul unor observaţii *indirecte*, efectuate de cele mai multe ori *in vivo*. Localizarea preferenţială a hormonilor marcaţi radioactiv în anumite ţesuturi a întărit ideea interacţiunii lor cu unele componente tisulare cu rol de receptor. De aici pornesc studiile *directe* ale interacţiunii hormonilor cu receptorul şi în cîţiva ani datele de observaţie au proliferat masiv, astfel încît a fost necesar să fie prezentate în studii de sinteză [20, 22, 25, 26].

Sursa proliferării studiilor directe ale interacţiunii hormonilor cu receptorii rezidă în unele progrese teoretice şi tehnice în domeniul polipeptidelor hormonale.

Conceptul „*unităţii*" hormonilor polipeptidici este fructul aplicării largi a metodei de radioimunoanaliză elaborat de Berson şi Yalow în 1959—1960. Hormonii polipeptidici, care dau cont de aproximativ 75% din toţi hormonii mamiferelor, alcătuiesc o singură familie bazată pe numeroase asemănări de structură, de activitate biologică şi de antigenicitate. De aceea, este de aşteptat ca observaţiile obţinute cu un singur hormon să poată fi aplicate, în mod analog cu suficientă probabilitate şi altor hormoni polipeptidici. Metodele biologice, folosite pentru analiza hormonilor polipeptidici, mult diversificate au întreţinut o viziune fragmentară asupra acestei categorii de substanţe bioactive.

Conceptul unităţii hormonilor polipeptidici este întărit prin elaborarea, pe baze informaţionale, a unui nou concept privind acţiunea acestor hormoni la nivelul ţesuturilor, elaborat de Sutherland în 1970 [27]. Răspunsul tisular la un hormon polipeptidic (mesager primar) este mediat de un *mesager secundar* — cAMP (acid adenozin monofosforic ciclic). Hormonul are rolul de a activa adenil ciclaza, o enzimă prezentă în membranele plasmatice ale ţesuturilor-ţintă, care la rîndul său are rolul de a converti acidul adenozin-trifosforic (ATP) în AMP ciclic. Dar, pentru ca un hormon (H) să activeze adenil ciclaza, declanşînd astfel o secvenţă de evenimente care culminează cu răspunsul tisular la hormon, pentru aceasta trebuie ca mai întîi să fie legat la nivelul receptorului (R). Radioreceptor analiza (RRA) hormonilor şi metoda de detectare şi măsurare a receptorilor în ţesuturi se bazează pe acest proces de legare a H la R, considerat ca evenimentul primar al interacţiunii H cu ţesutul-ţintă.

Progresele tehnologice, care au permis abordarea analizei directe a interacţiunii H—R, sînt:

— metodele de izolare, purificare şi caracterizare a hormonilor polipeptidici şi obţinerea polipeptidelor de sinteză (vezi § 2.2.1—2.2.3);

— metodele de izolare şi caracterizare a componentelor subcelulare [28, 29];

Scanned with OKEN Scanner

—metodele de radioiodurare a hormonilor polipeptidici cu activitate specifică mare, cu conservarea activității biologice și a structurii chimice.

Unele rezerve metodologice privind fenomenul adsorbției nespecifice pe suprafețe a polipeptidelor radiomarcate au fost depășite prin demonstrația competiției cantitative între H nemarcat și H marcat pentru situsurile de legare ale R. Astfel s-a putut trece la validarea primelor sisteme H—R pentru ACTH [30] și angiotensină [31].

Deoarece R posedă multiple funcții în interacțiunea cu H, în cele ce urmează prin R se va înțelege numai totalitatea situsurilor de legare specifică a H, adică funcția de recunoaștere specifică.

Este general acceptată definiția *concentrației* R ca număr de situsuri de legare per celulă, iar a *capacității* de legare a R ca număr de situsuri de legare per miligram de proteină receptoare.

Principiul evaluării directe a relației H—R prin studiul legării a fost enunțat astfel [22]: hormonul marcat (*H) se leagă la receptor și poate fi dislocat progresiv crescînd concentrația hormonului nemarcat (H), care intră în competiție pentru un număr limitat de situsuri de legare ale receptorului (R); hormoni structural diferiți (h), chiar în exces, nu pot disloca *H (fig. 5.2). În acest fel se poate aprecia *specificitatea* reacției de legare a H la R. Dacă sînt cunoscute cantitățile de R și de *H prezente în amestecul de reacție, atunci separarea *H liber de cel receptat, după atingerea echilibrului (a stării staționare) permite calculul constantei de afinitate. De reținut că nu se atinge un echilibru real ci numai o stare oarecum staționară.

Practic, numărul de situsuri receptoare dintr-un preparat dat nu este cunoscut și de aceea valoarea constantei de afinitate (K_a) și numărul de receptori se obțin din analiza Scatchard a curbei doză-răspuns [22].

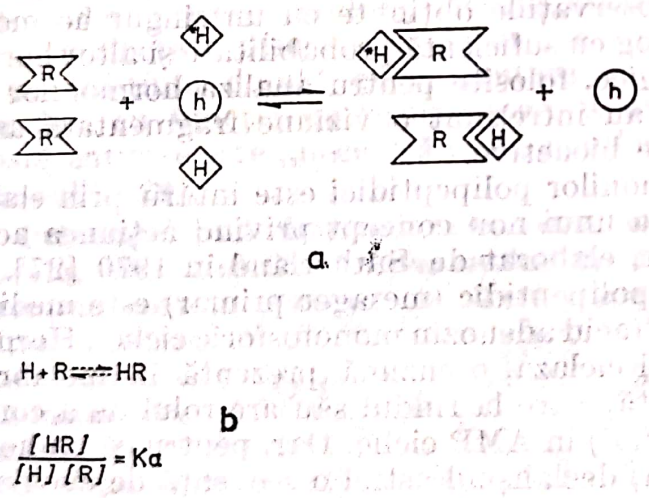


Fig. 5.2. — Reprezentare schematică a competiției dintre hormonul marcat (*H) și cel nemarcat (H) pentru situsurile de legare ale receptorului (R); hormonul structural sau biologic diferit (h) nu intră în competiție. *a*) Specificitatea interacțiunii H—R; *b*) relație care permite calculul afinității (K_a) și al numărului situsurilor de legare (după ref. [22]).

Metoda de măsurare a legării specifice necesită un radioligand și receptori.

Radioligandul. Metoda de marcare a H polipeptidici cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T folosită pentru RIA și CBPA, oferă radioliganzi adecvați și pentru metodele radioreceptoare. Unii autori recurg la mici modificări, care constau în restricția numărului de atomi radioactivi per moleculă la 0,2—1 atomi de iod [26]. Verificarea integrității *H se face prin trei tehnici mai importante: precipitare cu TCA pentru H polipeptidici mari, prin adsorbție pe o pulbere adsorbantă (de exemplu talc) și prin legare la R urmată de disociere și de re-legare la R proaspăt [32].

Scanned with OKEN Scanner

Receptorii au fost studiaţi folosind cinci tipuri de preparate din ţesuturi (tabela 5.3) : celule intacte, omogenat global de ţesut, fracţiuni plasmatice brute, membrane plasmatice purificate şi, în ultima vreme, şi citosolul celulelor explodate [18].

TABELA 5.3

Preparate de receptori tisulari

Receptorul	Preparatul de celule	Sursa	
		Tipul de celule	Mod de obţinere
Corpuscular	celule intacte	globule albe	circulante
		fibroblaste	cultură
		celule gonadice	cultură
		celule timice	dispersie mecanică
		adipocite	tratare enzimatică
		hepatocite	
Solubilizat	omogenat de ţesut	orice celulă cu receptori	dispersie mecanică şi sedimentare prin centrifugare
	membrane plasmatice preparate corpusculare		purificare prin centrifugare diferenţiată tratare cu detergenţi, dializă ± purificare prin cromatografie (simplă sau de afinitate)
Solubil	citosolul celulelor explodate		centrifugare ± purificare prin cromatografie (simplă sau de afinitate)

Schema procedeului tipic de determinare a legării specifice a *H la R este redată în figura 5.3. Selecţia mediului de incubare depinde de sistemul *H—R cercetat, iar pH-ul optim este în general 7,0—7,4 [33], cu excepţia legării TSH la R din tiroida bovină care este optimă la pH = 5,5

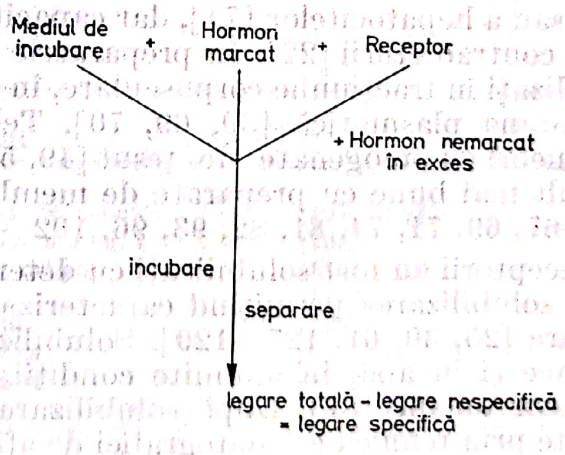


Fig. 5.3. — Schema procedeului de determinare a legării specifice a hormonului marcat [167].

[34]. Măsurarea legării este iniţiată prin adăugarea *H şi a preparatului de R într-o serie de eprubete, în jumătate din numărul lor adăugîndu-se şi H(hormon nemarcat) în exces. După incubare, reacţia este întreruptă prin diluarea şi răcirea amestecului de reacţie, urmînd separarea *H legat de R de *H liber prin filtrare sau centrifugare [35].

Se defineşte ca legare totală radioactivitatea receptată (legată) în absenţa H nemarcat, în exces. Legarea nespecifică este radioactivitatea legată în prezenţa H nemarcat, în exces.

Legarea specifică se calculează scăzînd legarea nespecifică din cea totală (fig. 5.3). Legarea nespecifică reprezintă capturarea „fizică" a *H la R, adsorbţia pe filtre şi pe eprubete [22]. Cu ajutorul acestei scheme generale de lucru au fost detectate numeroase sisteme de legare specifică *H—R (tabela 5.4), unele servind şi pentru măsurarea hormonilor în lichidele şi ţesuturile biologice prin tehnica de RRA.

Legarea *H la R creşte dacă creşte fie concentraţia *H, fie concentraţia R; creşte de asemenea cu temperatura, fiind maximă între 25 şi 37°C, deşi la 37°C disocierea este accelerată. Disocierea *H de pe R poate fi obţinută prin diluarea amestecului de incubare sau adăugînd H nemarcat în exces.

Specificitatea este demonstrată prin inhibiţia competitivă cu H nemarcaţi biologic înrudiţi, nu şi cu H neînrudiţi. Intensitatea competiţiei reflectă activitatea biologică a H nemarcat. De exemplu, R ai hormonilor lactogeni conţin 3 clase distincte de situsuri de legare: *HGH se leagă la toate trei clasele, competiţia receptorului de HGH este realizată numai de HGH, a receptorilor lactogeni cu HGH, GH de la primate, cu prolactină şi lactogen placentar nu şi cu GH de la neprimate, cu insulină sau cu ACTH. La receptorii GH competiţionează numai GH de la om, primate şi neprimate, nu şi prolactina, lactogenul placentar, insulina sau ACTH [22]. Aceste rezultate confirmă, la nivel molecular, proprietăţile biologice observate prin metode *in vivo* şi anume: HGH stimulează lactaţia şi creşterea la om şi la animal, GH de la neprimate nu stimulează lactaţia şi creşterea la om iar prolactina şi lactogenul placentar sînt stimulatori slabi ai creşterii.

Preparatele de receptori (tabela 5.4.). Pentru studiul legării *H sînt potrivite o mare varietate de preparate de celule intacte, de exemplu globulele albe circulante şi de cultură [26] sau culturi monostrat de fibroblaste [95]. Se foloseşte şi dispersia mecanică a celulelor pentru gonade [47, 55, 58, 59, 125] sau pentru izolarea limfocitelor din timus [91, 103]. Tratarea enzimatică este folosită pentru izolarea celulelor adipoase [67, 76, 81, 110] sau a hepatocitelor [74], dar capacitatea de legare scade şi rezultatele sînt contradictorii [22]. În preparatele de celule explodate, receptorii sînt localizaţi în fracţiunile corpusculare, în special dar nu în exclusivitate în membrana plasmatică [39, 69, 70]. Tehnica legării H la R reuşeşte numai uneori cu omogenate de ţesut [49, 54, 57, 58, 116, 117], rezultatele fiind mult mai bune cu preparate de membrane plasmatice purificate [39, 48, 65—67, 69, 71, 74, 81, 82, 93, 96, 102—105, 115, 126].

Receptorii au fost solubilizaţi cu detergenţi (Triton X—100, Lubriol-Px etc.) solubilizarea permiţînd caracterizarea mai detaliată a proteinelor receptoare [25, 30, 61, 127—129]. Solubilizarea proteinelor receptoare s-a putut face şi în apă, în anumite condiţii, de exemplu pentru receptorii limfocitelor umane [87]. După solubilizare, proteinele receptoare au fost purificate prin tehnica cromatografiei de afinitate [25, 61].

Proprietăţile de legare ale R solubili sînt similare cu ale celor fixaţi pe membrane dar uneori sînt observate diferenţe în sensul creşterii afinităţii prin solubilizare şi purificare.

S-a încercat să se studieze interacţiunea H—R pe modele *in vivo* injectînd H marcat la animal. Rezultatele nu au fost decît rareori satisfăcătoare deoarece cantitatea de *H intact legată de R, chiar *imediat* după

Scanned with OKEN Scanner

TABELA 5.4

Sisteme hormon polipeptidic-receptor [22, 25, 26]

Radioligand	Țesut receptor	Bibliografie
ACTH	cortico-suprarenala	[24, 30, 36–39]
Hormon de creștere	limfocite umane	[32, 40–44]
	ficat	[34, 44]
Gonadotrofine		
HCG	testicul	[45–49]
	ovar	[45, 46, 50–56]
LH	testicul	[46, 50, 56, 57]
	ovar	[58]
FSH	testicul	[59]
Prolactină	țesut mamar	[60–62]
	ficat și alte țesuturi	[63, 64]
TSH	glanda harderiană	[65]
	antehipofiză	[66]
	tiroidă	[33]
Insulină	ficat	[67–69]
	țesut adipos	[67, 72, 76, 77, 80–86]
	limfocite	[33, 40, 87–93]
	monocit	[34]
	fibroblaste	[35]
	placentă	[22, 35]
	alte țesuturi	[22, 63]
Glucagon	ficat	[96–101]
	celule beta pancreas	[102, 103]
	țesut adipos	[96]
Calcitonină	rinichi	[104, 105]
	os	[105]
Parathormon	rinichi	[106]
Oxitocină	pielea de broască	[107, 108]
	glanda mamară	[109]
	țesut adipos	[110]
	uter	[111]
Vasopresină	rinichi	[112]
LH-RH	hipofiza	[113, 114]
TRH	hipofiza	[115]
Angiotensină	rinichi, CSR, alte	[31, 116–118]
Catecolamine[a]		
noradrenalină	miocard	[119, 120]
	capsula splenică	[121]
	ficat	[122]
adrenalină	eritrocite	[123]
	creier	[124]

[a] Nu sînt polipeptide, dar în interacțiunea cu receptorul se comportă similar cu acestea.

injecție este redusă prin dislocuirea de către *H intact și degradat liber prezent în lichidele extracelulare adiacente. Modelul *in vivo* a permis totuși analiza relației H—R de exemplu pentru *HCG-ovar [50, 53, 125]. Sînt preferate însă modelele *in vitro*, care sînt mult mai flexibile [26].

Caracterizarea legării H la R. Funcția de legare aparține unor substanțe receptoare de natură proteică, intim legate cu lipidele de membrană — greutățile lor moleculare variază în limite foarte largi și au fost determinate *GM* de ordinul a 10^4 pentru receptorul adrenalinei [120] și al prolactinei [135], de 10^5 pentru receptorul glucagonului, HCG și insulinei [22] și de ordinul 10^6 pentru receptorul ACTH [138].

Eliminarea cromatografică a componentei lipidice după solubilizarea cu detergenți a receptorului, duce la micșorarea situsului de recunoaștere, ceea ce ar sugera că componenta lipidică influențează conformația situsului de recunoaștere [137].

În cursul măsurării legării cu R solubilizați pot apărea artefacte generate de micelii lipidice care capturează *H mimînd proteina solubilizată. În urma solubilizării cu detergenți pot apărea efecte ale micilor cantități de detergenți rămase după dializă și care se leagă strîns de proteinele receptoare [22].

— Viteza de legare depinde în mod direct de concentrația H, de concentrația R, de temperatură și de timpul de incubare. La 37° și în prezența unor concentrații de *H mai mari *dar în limite fiziologice*, se obțin stări staționare în cîteva minute [26].

La temperatură joasă sau în prezența unor concentrații mici de *H, starea staționară nu se obține nici în cîteva ore [26].

— Constantele de afinitate (K_a) ale H pentru R sînt mari [26] și concordă cu nivelul circulant al H care determină efecte fiziologice *in vivo* și cu concentrația H necesară pentru a obține efecte *in vitro*.

Numărul situsurilor de legare per celulă este de ordinul a 10^6 și au fost observate, prin analiza Scatchard, două ordine de situsuri, din care unul cu K_a mai mic dar dominant numeric.

— Specificitatea este demonstrabilă cu ajutorul inhibiției competitive a reacției dintre *H și R cu ajutorul H nemarcat, al analogilor săi și al substanțelor neînrudite.

— Starea de echilibru în reacția *H—R. Afinitatea și numărul de situsuri de legare pe un preparat de receptori se estimează cu ajutorul analizei Scatchard pe o curbă doză-răspuns. Datele numerice obținute sînt doar aproximații utile, deoarece deși au fost furnizate în cursul stării staționare a reacției *H—R, nu se poate preciza dacă este vorba de un echilibru real. Starea de echilibru este greu de obținut și de apreciat întrucît preparatul de membrane conține activitatea de degradare care poate interfera procesul de legare a H la R. Totuși, rezultatele aproximative obținute arată că situsurile au o afinitate suficient de mare pentru a lega H prezent în concentrații fiziologice.

— Localizarea *in vitro* a porțiunii bioactive a unui H pe un preparat de R este încă obiect de studiu. Observația că un suport insolubil este capabil să rețină activitatea biologică a unui H cuplat pe el, a generat ipoteza că situsurile R sînt localizate pe fața externă a membranei plasmatice. Ipoteza a fost sprijinită de observația că preparatele de membrane plasmatice foarte purificate sînt mult mai bogate în situsuri de legare decît omogenatele totale de țesut [77]. Mai mult, după administrarea *in vivo* a *H, radioactivitatea apare asociată cu membrana plasmatică a țesutu-

Scanned with OKEN Scanner

rilor-ţintă [130—133], rezultate confirmate şi cu ajutorul conjugatelor H—feritină [132].

— Procesul de legare şi cel de degradare sînt două entităţi distincte, prezente probabil în aceleaşi fracţiuni subcelulare [72, 96, 99, 101, 104, 107, 117, 118, 135]. S-a arătat pe de o parte că *H disociat de pe R este intact, că în timp ce este legat la R este protejat de degradare şi că numai *H liber din mediu este susceptibil de degradare enzimatică [26]. Degradarea este maximă în citosol, deci acţiunea degradativă ar aparţine unei fracţiuni solubile, dar şi fracţiunile insolubile au un oarecare efect de degradare asupra *H [22]. Totuşi, unele cercetări asupra situsurilor de degradare a glucagonului [99] sugerează o strînsă legătură cu situsurile de legare. De aceea se presupune că situsurile de degradare ar avea un rol fie în terminarea acţiunii hormonale, fie în reglarea locală a concentraţiei hormonului [22]

Asocierea cu receptorul şi efectele hormonale. Se consideră că *legarea* H la R duce la *activarea* unei secvenţe de evenimente, care culminează cu răspunsul caracteristic al ţesutului-ţintă.

Pentru mulţi H polipeptidici, legarea creşte activitatea adenil ciclazei crescînd apoi nivelul tisular al AMP ciclic cu rol în medierea multor efecte ale H [27].

Un rol important în această succesiune de evenimente îl au elementele chimice. De exemplu, pentru ca ACTH să stimuleze steroidogeneza celulei CSR este necesar Ca^{2+}. S-a arătat că, în absenţa Ca^{2+} legarea ACTH nu este influenţată dar este inhibată complet capacitatea sa de a stimula adenil ciclaza. Adăugînd Ca^{2+}, răspunsul adenil ciclazei la ACTH se restabileşte, legarea rămînînd neinfluenţată [36]. Analogii de sinteză ai ACTH se leagă la receptor mimînd H natural dar nu activează adenil ciclaza [39]. Din studiul analogilor ACTH a reieşit că pentru activare sînt necesare reziduurile 4—10 din molecula de ACTH, iar pentru legare reziduurile 15—18.

Disocierea procesului de legare al H la R de cel al activării adenil ciclazei pare să fie un aspect mai general al interacţiunii H—R [22]. Rezultă deci că activarea nu este implicată în legare, că cele două procese sînt distincte antrenînd, cel puţin pentru unii H, secvenţe diferite din molecula polipeptidului hormonal [22]. S-a observat că cuplul celor două procese poate fi modulat [22, 112] prin o varietate de intervenţii endo- şi exogene.

Rezultatele furnizate de studiile asupra interacţiunii H—R au modificat viziunea tradiţională asupra *relaţiei H—ţesut-ţintă.* Într-o serie de ţesuturi considerate neţintă, au fost puşi în evidenţă receptori hormonali. Au fost descrişi receptori ai insulinei în limfocite [93] şi în placentă [35, 137] şi un receptor specific pentru lactogeni în ficatul de şobolan [22, 35].

Prezenţa într-un ţesut a receptorului specific pentru un hormon sugerează un rol funcţional al acelui hormon la nivelul acelui ţesut, rol care poate fi demonstrat prin efectele biologice ale hormonului folosind concentraţiile sale fiziologice. Ipoteza a fost frecvent confirmată, de exemplu, insulina în concentraţii fiziologice are efecte biologice asupra limfocitului [89].

S-a presupus că intensitatea răspunsului unui ţesut-ţintă la un H efector este direct proporţională cu *numărul de situsuri receptoare ocupate* de efector. S-a arătat însă că cel puţin pentru o serie de H polipeptidici în realitate nu este aşa şi că de exemplu testiculul de şobolan atinge steroido-

geneza maximă cu o ocupare de numai 1% a situsurilor receptoare de către HCG [138].

În scopul de a raționaliza semnificația acestui exces de R (R „disponibili" sau „de rezervă") a fost elaborat un model teoretic. Prin modelul matematic propus [139] se admite că fiecare celulă răspunde la un H efector în conformitate cu legea „tot sau nimic" numai atunci cînd numărul situsurilor receptoare ocupate per celulă depășește un anumit „prag". Conform legii acțiunii maselor ar rezulta că probabilitatea ca un situs receptor să fie ocupat depinde și de concentrația efectorului H dar și de concentrația (număr/celulă) situsurilor receptoare. Așadar, cînd concentrația situsurilor receptoare este mare, concentrația H efector necesară pentru a ocupa numărul „prag" de situsuri este mai mică decît atunci cînd concentrația situsurilor receptoare este redusă. De aceea, concentrația mare a situsurilor receptoare ar implica o sensibilitate exacerbată la H efector. S-ar mai putea specula și că, la grad înalt de ocupare a situsurilor receptoare, răspunsul tisular la H ar fi crescut în raport cu timpul (viteză crescută).

A fost elaborată și o altă ipoteză asupra disponibilității R: situsurile receptoare sînt eterogene, putînd exista simultan mai multe clase, fiecare cu alt rol în realizarea răspunsului tisular la un hormon efector [22].

Cuplul H—R este supus unor intervenții modulatoare.

Se consideră interacțiunea H—R ca o reacție bimoleculară (fig. 5.2) care, conform legii acțiunii maselor, la echilibru se poate exprima prin relația:

$$HR = K_a(R_0 - H^R)(H_0 - H^R),$$

unde HR = concentrația complexelor hormon-receptor, H_0 = concentrația inițială a H, R_0 = concentrația inițială a R, iar K_a = constanta de afinitate.

Răspunsul țesutului este funcție de HR și depinde astfel, implicit, de trei parametri: H_0, R_0 și K_a.

A devenit evident, mai ales ca urmare a studiilor RIA, că sensibilitatea la H suferă modificări semnificative. De exemplu, obezitatea, stările cu exces de GH sau de glucocorticosteroizi sînt caracterizate prin rezistență la insulină.

S-a arătat că legarea H la R poate fi modulată prin modificările operate la R și anume modificînd fie afinitatea (K_a), fie numărul de situsuri receptoare (R_0).

Eterogenitatea R în ceea ce privește *afinitatea* pentru H apare evidentă prin analiza Scatchard, curba doză-răspuns apărînd neliniară cu concavitatea în sus [22, 93]. Neliniaritatea ar mai avea însă și alte surse decît eterogenitatea R, și anume unele interacțiuni de „cooperare negativă" între situsurile receptoare înseși. S-a putut observa că pe măsură ce situsurile receptoare sînt ocupate progresiv cu H, restul situsurilor neocupate își reduc afinitatea lor pentru H [140—142].

Afinitatea mai poate fi influențată și prin intervenții exterioare necompetitive, de exemplu adăugînd substanțe care o modifică, așa cum s-a observat cu nucleotidele guanilice care scad afinitatea glucagonului pentru receptorul hepatic [143].

Și capacitatea de legare (numărul de situsuri per miligram de proteină de membrană), ca și afinitatea, nu rămîn constante ci suferă fluctuații semnificative.

Scanned with OKEN Scanner

În stările de insulino-rezistenţă cu hiperinsulinemie scade legarea insulinei pe preparatele de celule intacte sau de membrane şi la om şi la animal. De exemplu, membrana hepatocitului de la şoareci cu sindrom obezitate-hiperglicemie moştenit recesiv (ob/ob) leagă insulina în proporţie de numai 16—35% faţă de şoarecii intacţi născuţi odată (gemeni) [73]. Aceasta reflectă o diminuare a numărului de situsuri de legare a insulinei per celulă, pe cînd legarea glucagonului şi a GH nu este influenţată [74]. La şoarecii ob/ob scade R_0 pentru insulină în membrana adipocitelor şi a limfocitelor timice [144]. R scade şi la şobolanii cu rezistenţă la insulină datorată tumorilor secretoare de GH, prolactină sau ACTH [145].

Ipoteza ocupării situsurilor prin creşterea excesivă a concentraţiei H nu a fost confirmată ci dimpotrivă, s-a observat că cultura de limfocite expusă *cronic* la concentraţii mari de insulină în mediu a dus la reducerea capacităţii de legare a acestor celule [78]. Reiese că menţinerea cronică a unor concentraţii mari de H poate *reprima* concentraţia receptorului partener [146], ca şi cînd s-ar induce o stare de „saţietate" (nu de saturare) a R faţă de H.

S-a confirmat şi situaţia opusă, şi anume că menţinerea în mod cronic a unor concentraţii reduse de H în ţesuturile receptoare obţinute de la animal, duce la creşterea capacităţii de legare a H [147] ca şi cînd s-ar induce pe această cale o stare de „foame" de H în R.

Fenomenul modulării pare să fie general şi a fost observat şi în relaţia hormoni lactogeni-receptor lactogen hepatic, în cursul sarcinii şi al dezvoltării [22, 148].

Rezumînd, se desprinde ideea că hormonii polipeptidici au un rol în reglarea concentraţiei receptorilor parteneri la nivelul ţesutului lor ţintă [22]. Din cercetările asupra procesului de legare rezultă un mecanism general de variaţie a sensibilităţii tisulare la hormoni prin modularea procesului de legare fie prin modificarea afinităţii, fie prin modificarea capacităţii de legare [22].

Cuplul H—R este folosit în practică în două scopuri: pentru dezvoltarea metodei de analiză cu receptori şi pentru măsurarea concentraţiei şi a capacităţii de legare a R în celule şi în fracţiunile subcelulare ca indice al sensibilităţii tisulare la hormoni.

Radioreceptor analiza (RRA) este bazată pe acelaşi principiu de legare competitivă ca şi RIA. Competiţia depinde însă de bioactivitatea moleculei H şi nu de similitudinea imunochimică cu un preparat standard. Prima metodă pentru măsurarea hormonilor polipeptidici cu ajutorul receptorilor a fost aplicată la ACTH şi a primit denumirea generală de radioreceptor analiză (RRA) [24].

Materialele principale folosite în RRA sînt hormonul polipeptidic marcat şi un preparat convenabil de receptor.

Inventarul avantajelor RRA nu este încă încheiat. RRA pune în evidenţă porţiunea bioactivă a substanţelor biologice ca şi biodozarea. Faţă de biodozare prezintă unele avantaje: este mai rapidă, mai eficientă dar şi mai subtilă. RRA nu furnizează însă în mod necesar informaţii identice cu biodozarea, deci nu o înlocuieşte ci este numai un adjuvant important.

Faţă de RIA, RRA măsoară o varietate de substanţe structural şi deci imunologic diferite dar cu activităţi biologice comparabile. De exemplu, somatomedinele sau activitatea insulinică nesupresibilă (NSILA = non suppressibile insulin-like activity) sînt substanţe similare şi deşi sînt

imunochimic distincte de insulină, au efecte biologice care mimează pe cele ale insulinei [149]. Capacitatea acestora de a competiționa cu insulina pentru situsurile de legare ale receptorului insulinei [84, 150] a permis dezvoltarea tehnicii pentru măsurarea lor [22, 149, 150]. Citeva somatomedine au fost purificate, marcate cu ^{125}I și au fost construite sisteme RRA pentru determinarea lor în lichidele biologice [149]. Au fost realizate sisteme RRA pentru cantificarea unei serii de hormoni polipeptidici: hormoni lactogeni, GH, gonadotrofine hipofizare și corionice [45, 56, 57 ș.a.]. Detectarea HCG prin RRA poate servi și ca test precoce de sarcină [151].

Concepția conform căreia anumite boli ar putea fi datorate unui defect al receptorului nu a avut credit decît în urma observației că afinitatea situsurilor receptoare pentru insulină este diminuată la șoarecii insulinorezistenți ob/ob [74]. Extensiunea acestor studii în clinica umană a intrat în practică odată cu identificarea receptorilor insulinei în populația de globule albe circulante, ușor accesibile. S-a observat că în unele stări de insulino-rezistență cu hiperinsulinemie ca de exemplu obezitatea, nu însă și acromegalia, scade concentrația receptorului insulinic și deci legarea insulinei marcate pe globulele albe circulante [33, 92, 94]. Și în diabetul cu obezitate și în cel cu debut la maturitate concentrația receptorului insulinic scade [33, 92]. După scăderea în greutate la obezii supuși regimului hipocaloric, capacitatea de legare a receptorului crește, deci procesul este reversibil, persistînd numai atît timp cît insulinemia este mare. Or, pentru a postula o „boală de receptor" ar trebui ca diminuarea concentrației receptorului să persiste și după abolirea hiperinsulinismului cronic. Devine deci clar că acest tip de deficit al receptorului este un fenomen secundar unei hiperhormonemii cronice.

Stări cu deficit de receptor similare sînt nanismul cu concentrații mari de HGH și somatomedină redusă [152] și pseudohipoparatiroidismul [153]. Posibil că și diabetul insipid vasopresinorezistent, care este un sindrom ereditar, ar putea să fie o complicație secundară altei boli [25].

Exemple de situații opuse, adică de creștere a sensibilității receptorului sînt mai rare. Potențial, receptorii catecolaminelor ar putea să devină hipersensibili după denervare și în cursul procesului de îmbătrînire [25]. Anumite forme de tulburări circulatorii hiperchinetice și anumite cazuri de hipertensiune ori hipertiroidie ar putea prezenta un oarecare grad de hipersensibilitate la catecolamine.

În perspectiva terapeutică, se prevede că stabilirea conținutului tisular în receptori ar putea influența conduita clinică și alegerea modalității terapeutice [22]. De exemplu, hipofizectomia are unele efecte în remisia metastazelor din cancerul mamar la unele paciente. S-a demonstrat că la șobolanii cu tumori mamare stimulate cu prolactină concentrația receptorilor prolactinei este mai mare decît la cei nestimulați (deci se poate induce un număr sporit de situsuri de legare per celulă). Este posibil ca diferențele de concentrație ale receptorilor prolactinici să poată permite diferențierea pacientelor cu cancer mamar metastazat, care pot beneficia de hipofizectomie [22].

5.3.3. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

Avantajele receptorilor proteici insolubili, asociați membranelor celulare folosiți în dozarea hormonilor polipeptidici și a celor solubili în citoplasma celulelor țintă pentru hormonii steroizi constau în special în

capacitatea lor de recunoaştere a porţiunii hormonal active. Un inventar sumar al avantajelor şi dezavantajelor utilizării lor în sistemele de dozare hormonală este prezentat în tabela 5.5.

TABELA 5.5

Avantaje şi dezavantaje ale metodelor RRA [154]

Avantaje	Dezavantaje
Funcţia de recunoaştere : recunosc porţiunea hormonal activă a moleculei de H Relaţia între specii : sistemul de analiză validat pentru un hormon de la o specie poate fi folosit pentru mai multe specii Relaţia intraspecie : un preparat de receptori validat pentru cantificarea unui hormon, poate fi folosit pentru mai mulţi hormoni Tehnica de separare : preparatele de celule intacte nu necesită agent de separare GM mare a R nu pune probleme în cursul separării	Concentraţia tisulară : redusă, necesită operaţii de purificare şi concentrare Randamentul : preparatele de R sînt instabile, necesită reînnoiri de cîteva ori pe an

Distribuţia preparatelor de celule intacte sau a suspensiilor de fragmente de membrane implică unele strategii pentru asigurarea unei dispersii omogene.

În comparaţie cu metodele RIA, condiţiile de incubare (mediu, pH, temperatură) solicită analiza individuală nu numai a fiecărui hormon, ci a fiecărui cuplu H—R, din acest punct de vedere metoda fiind mai puţin versatilă.

Evaluarea rezultatelor unui sistem de dozare se face stabilind parametrii de specificitate, sensibilitate şi precizie. Sensibilitatea şi precizia se apreciază prin date numerice.

Pentru stabilirea gradului de specificitate a reacţiei unui cuplu H—R, este necesar ca legarea la receptor a hormonilor similari să fie proporţională cu activitatea lor biologică, alţi hormoni neînrudiţi să dea legări neglijabile, valorile din plasmă să coreleze cu starea clinică iar valorile numerice obţinute prin RRA să concorde sensibil cu cele obţinute prin RIA sau prin biodozare. De reţinut că ultima este necesară dar nu obligatorie.

Unele descoperiri dobîndite cu ajutorul RRA deschid calea cercetărilor relaţiei structură-funcţie pentru hormonii polipeptidici şi a rolului biologic al precursorilor şi metaboliţilor hormonilor steroizi. Influenţele farmacologice asupra interacţiunii H—R [155] sau ontogenia receptorilor hormonilor sexuali [156] sînt numai cîteva din aspectele care se cer rezolvate. Informaţiile asupra receptorilor farmacologici [157] pot fi amplu utilizate pentru înţelegerea fiziologiei receptorilor hormonali.

În stadiul actual însă, cunoştinţele despre receptori în general (ai substanţelor hormonal active sau ai celor antigenic active) nu sînt suficient de precise, caracterizarea lor rezumîndu-se la cîteva proprietăţi fizico-chimice ca masă, eterogenitate, specificitate, afinitate. Dealtfel, dacă se iau în considerare două aspecte, şi anume că orice hormon este şi haptenă sau chiar antigen şi că hormonii au receptori şi pe celulele implicate în reactivitatea la antigene [158], rezultă că studiul receptorilor şterge în bună măsură diferenţele între sistemul imunitar şi cel endocrin, stabilind poate unele conexiuni [159].

Scanned with OKEN Scanner

5.4. VARIANTE ŞI METODE DE PERSPECTIVĂ

Odată statuat principiul metodei RIA, prin care o substanţă necunoscută intră în competiţie cu o substanţă marcată pentru situsurile de combinare ale unui anticorp, două alte categorii mari de metode au adus schimbări prin înlocuirea anticorpului cu proteine plasmatice (metodele CBPA) sau receptoare (metodele RRA).

Alte variante au vizat înlocuirea marcherului proteinei de legare sau a ligandului (substanţa care este legată) în scopul de a evita folosirea radioizotopilor.

Fluorocromii au fost folosiţi înaintea radioizotopilor dar sensibilitatea oferită de acest tip de marcare nu este suficientă pentru măsurarea unor concentraţii de ordinul a 10^{-15}g/ml. Deşi nu au intrat în practica curentă, metoda de marcare cu virusuri — viroimunoanaliza [160, 161] şi metoda de marcare cu enzime — analiza imunoenzimatică, reprezintă totuşi alternative ingenioase pentru situaţiile în care concentraţia substanţei active este suficient de mare precum şi atunci cînd nu poate fi asigurată accesibilitatea metodelor radioizotopice. Înlocuirea trasorului atrage, implicit, înlocuirea metodei de măsurare prin spectrometrie gamma sau beta cu spectrofotometrie sau luminometrie.

Recent, atenţia a fost îndreptată simultan spre ligand şi spre tehnica de separare. S-a reuşit să se obţină sisteme de analiză directe, fără substanţă marcată, care au făcut inutilă faza de separare. Principiul constă din măsurarea prin nefelometrie a turbidităţii produsă de concentraţii seriate de antigen cu o cantitate fixă de anticorp.

BIBLIOGRAFIE

1. R.P. Ekins, *Clin. Chim. Acta*, **5**, 453 (1960).
2. L.E.M. Miles, C.N. Hales, *Nature*, **219**, 186 (1968).
3. L.E.M. Miles, C.N. Hales, *Biochem. J.*, **108**, 611 (1968).
4. H.B. Brewer Jr., în „Endocrinology 1971", editat de S. Taylor, Heinemann Medical, London, 1972, p. 324.
5. J. Markussen, K.H. Jørgensen, L.G. Heding, *Horm. Metab. Res.*, **2**, 53 (1970).
6. S.P. Masouredis, *J. Clin. Invest.*, **39**, 1450 (1960).
7. N.C. Hughes-Jones, B. Gardner, R. Telford, *Biochem. J.*, **88**, 435 (1963).
8. R.P. Ekins, *Clin. Chem. Acta*, **5**, 453 (1960).
9. S.P. Rothemberg, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 45 (1961).
10. B.E.P. Murphy, W. Engelberg, C.J. Patee, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**, 293 (1963).
11. B.E.P. Murphy, în „Nuclear Medicine", editat de H.N. Wagner, H.P. Publ. Co., Inc. Publ., N.Y., 1975, p. 233.
12. B.E.P. Murphy, *Nature*, **201**, 679 (1964).
13. R.P. Levy, J.S. Marshall, N.L. Velayo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 372 (1971).
14. B.U. Musa, U.S. Seal, R.P. Doe, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **27**, 768 (1967).
15. H.E. Rosenthal, W.R. Slaunwhite Jr., A.A. Sandberg, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 352 (1969).
16. R.P. Doe, P. Dickinson, H.H. Zinneman, U.S. Seal, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 767 (1969).
17. B.E.P. Murphy, în Principles of Competitive Protein — Binding Assays, editat de W.D. Odell şi W.H. Daughaday, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1971, p. 108.
18. E.E. Baulieu, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1743 (1975).
19. P. Cuatrecasas, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 169 (1974).
20. D. Rodbard, în „IAEA Training course on RIA techniques", Pisa, Italia, 3—14 mai 1971, SC/217 ITA.
21. E.R. Gold, C.F. Phelps, *Z. Immun. Forsch.*, **143**, 430 (1972).
22. B.I. Posner, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **53**, 689 (1975).

Scanned with OKEN Scanner

Încheiere :

APLICAȚII ALE METODELOR DE ANALIZĂ RADIOCOMPETITIVĂ ÎN MEDICINA UMANĂ

A. ASPECTE GENERALE

Cu anul 1960, marcat prin lucrările lui Berson și Yalow în S.U.A. și apoi ale lui Ekins în Anglia, urmate la scurt interval de cele ale lui B. Murphy în Canada, începe etapa radioimunologică și radiocompetitivă a medicinii.

Două concepte stau la baza acestei revoluții : un concept care aparține domeniului metodei (al tehnicii) și unul teoretic (metodologic). Conceptul tehnic, care constă în urmărirea procesului de legare al unui antigen la anticorpul specific folosind *antigene marcate*, a suferit el însuși o evoluție de peste o jumătate de secol. S-a pornit de la antigene marcate în mod *natural* (anul 1902) ca hemocianina : trasorul este cuprul și reacția este urmărită prin apariția culorii albastre, sau laptele : trasorul este conținutul mare în fosfor, pînă la antigene și haptene marcate *artificial* fie cu izotopi stabili (de exemplu ^{127}I), fie cu izotopi radioactivi (de exemplu ^{14}C, ^{3}H sau ^{131}I, ^{125}I etc.). Al doilea concept este cel al *specificității* interacțiunilor de tip antigen-anticorp, hormon-cărăuș, hormon-țesut țintă din care a derivat un principiu cu implicații tehnice. Acesta constă din analiza unei substanțe necunoscute — „mută" — adică nemarcată, urmărind capacitatea sa de a interveni prin competiție specifică în una din cele trei tipuri de interacțiuni specifice menționate. Aceste trei categorii de sisteme sînt sistemele de analiză radioimunologice (RIA), radiocompetitive prin legare la o proteină plasmatică (CBPA) sau la o proteină receptoare (RRA), pe care propunem să fie numite — provizoriu — cu un termen general de „radioanalize specifice competitive" sau prescurtat RASC.

Metodele RASC implică, în mod general, sisteme care conțin trei reactanți principali : o substanță marcată (de obicei cu un izotop radioactiv), o proteină de legare și substanța pe care dorim să o analizăm. Substanța marcată și cea nemarcată se lasă legate la proteina de legare și de aceea se numesc liganzi, respectiv radioligandul și ligandul „mut" sau „rece" adică nemarcat.

Inițial, s-a crezut că metodele RIA vor avea numai rolul de a șterge discrepanța dintre tehnologia înaintată a analizei hormonilor steroizi (datorată progreselor chimiei) și tehnologia analizei hormonilor polipeptidici practic absentă în clinica umană sau tributară metodelor biologice laborioase, cu randament redus, costisitoare și de o rezoluție adesea cu ordine de mărime peste concentrațiile fiziologice. Nu s-a putut bănui atunci că în curînd metodele RIA vor fi extinse și în domeniul hormonilor steroizi (neantigenici), că proteine naturale plasmatice sau

Scanned with OKEN Scanner

tisulare vor aduce în cîmpul practicii alte două categorii de metode : CBPA şi RRA.

În mai puţin de două decenii, pe tema RASC au fost organizate reuniuni naţionale [1—3] şi internaţionale [3—12], iar 30—60% din lucrările congreselor internaţionale axate pe probleme de reproducere umană [13] sau de endocrinologie [14, 15] folosesc metodele RASC sau coprodușii lor. Experienţa cercetătorilor şi datele acumulate într-un număr exploziv de publicaţii au fost sintetizate în lucrări monografice [16—19], în manuale [20—25], în broşuri cu caracter practic [26—31]. Tratatele care sînt dedicate metodelor de diagnostic [33, 32], medicinii nucleare [34—38] sau problemelor oncologice [39] conţin ample capitole referitoare la rolul metodelor RASC în aceste domenii.

Au fost organizate laboratoare operative şi de referinţă locale, regionale şi naţionale, pentru aplicarea metodelor RASC în practica medicală. Au fost organizate programe naţionale (Naţional Pituitary Agency Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases — S.U.A., National Institute for Biological Standards and Control — Anglia) şi internaţionale [40, 41] pentru a asigura laboratoarele cu reactivi standardizaţi şi pentru orientarea organizării lucrului. În unele ţări noua tehnologie a devenit accesibilă şi în mediul rural.

A fost dezvoltată industria aparaturii specializate pentru măsurarea automată a emisiilor radioactive, completată ulterior cu aparatură destinată automatizării fazelor preliminare şi de calcul. O industrie nouă : radioimunochimică, ramificată în instituţii cu profiluri diverse, asigură reactivii necesari, sub formă de prefabricate individuale sau de truse care conţin totalitatea reactivilor din sistem, uneori şi parte din utilaj.

Teoriile matematice elaborate în scopul proiectării, supravegherii şi controlului metodelor RASC au dus la o întreagă inginerie a programării automatizate cu ajutorul calculatoarelor electronice.

Extinse astăzi la majoritatea categoriilor de substanţe cunoscute, numărul sistemelor RASC a fost estimat în 1975 la 400 dar un inventar precis este dificil. Mai util ar fi un inventar al lucrărilor de diplomă şi de doctorat dedicate cercetărilor în acest domeniu precum şi al lucrărilor monografice pe aceste teme.

Organisme internaţionale ca Organizaţia Mondială a Sănătăţii (OMS) împreună cu Agenţia Internaţională pentru Energia Atomică (AIEA) şi-au asumat sarcini privind formarea specialiştilor, asigurarea cu preparate standard şi îndrumări privind controlul calităţii metodelor RASC [7, 12, 40, 41, 43].

B. CATEGORII DE SUBSTANŢE MĂSURATE PRIN METODE RIA ŞI SIMILARE

O gamă largă de substanţe biologic active, fiziologice şi nefiziologice, produse de secreţie glandulară tumorală sau tisulară, componente ale lichidelor şi ţesuturilor biologice, produse naturale sau de sinteză fac obiectul analizelor RIA, CBPA şi RRA (tabela 1).

Pentru marea majoritate au fost create sisteme de măsurare prin metode radioimunochimice (tabela 2); un număr redus de hormoni şi substanţe nehormonale sînt analizate prin metode neimunitare de tip

TABELA 1

Categorii de substanţe dozate prin metode RIA, CBPA sau RRA

- Secreţii endocrine şi ectopice
  - hormoni
  - izohormoni
  - precursori
  - metaboliţi
  - substanţe hormonoide
- Releasing-factori (liberine)
- Neurofizine
- Proteine
  - sanguine
  - tisulare
- Nucleotide ciclice
- Prostaglandine
- Acizi nucleici
- Enzime
- Antigene şi toxine microbiene
- Antigene virale
- Medicamente
  - de extracţie
    - animală
    - vegetală
  - de sinteză biologică
  - de sinteză chimică
- Substanţe asociate cu cancerul

TABELA 2

Substanţe dozate prin metode radioimunochimice

Hormoni peptidici şi precursori

STH
TSH
LH
FSH
ACTH
α-MSH
β-MSH
Prolactină
Oxitocină
Vasopresină
T_3
T_4
Calcitonină (CTC)
Parathormonul (Pth)
Insulină
Glucagon
Gastrină
Secretină
Colecistochinină-pancreozimină
Bradichinină
Angiotensina I, II
HCG
HPL
SRIF
LH/FSH-RF
TRH
Tiroglobulină
Proinsulină

Hormoni sterolzi

Testosteronă
Estronă
Estradiol
Estriol
Aldosteronă
Dihidrotestosteronă
Progesteronă ş.a.

Substanţe nehormonale

Somatomedine
Neurofizine
Endorfine, encefaline
Factor intrinsec
Fibrinogen
Factor reumatoid
Imunoglobuline şi alte proteine sanguine
Tranzine (TBG)
Antigen Australia
Eritropoietina
Acid folic
cAMP
Prostaglandine
Digoxină
Digitoxină
Morfină
Clorpromazină
LSD
Fructoză-1,6-difosfataza
Alfa-fetoproteina
Antigenul carcinoembrionar
Melatonină ş. a.

Scanned with OKEN Scanner

CBPA şi RRA (tabela 3). Numărul sistemelor de analiză radioreceptoare este în creştere dar aparţin încă domeniului cercetărilor nu şi al diagnosticului de rutină.

TABELA 3

Substanţe dozate în ajutorul metodelor radiocompetitive neimunitare

Substanţa	Reactivul specific
I. LEGARE COMPETITIVĂ LA PROTEINE PLASMATICE (CBPA)	
Hormoni	
T_4	TBG
Cortisol Corticosteronă Cortizonă 11-Dezoxicortizol	CBG
Progesteronă Testosteronă	SBG
Substanţe nehormonale	
Vitamina B_{12}	factor intrinsec
Acid folic	reductaza acidului folic
cAMP	fosfodiesterază
ARN „mesager"	ADN complementar
II. LEGARE COMPETITIVĂ LA RECEPTOR (RRA)	
STH	limfocite umane ficat şobolan
ACTH	CSR animal
Insulina	ficat şobolan limfocite umane
LH FSH HCG	testicul animal
Estrogeni	uter diferite specii

C. MĂSURAREA SUBSTANŢELOR BIOLOGIC ACTIVE ÎN CLINICA UMANĂ

Este necesar ca modalităţile de investigaţie a variaţiilor substanţelor biologic active în lichidele biologice cu aplicaţii în clinica umană să fie adaptate condiţiei clinice a individului bolnav sau a eşantionului dintr-o populaţie, mijloacelor disponibile şi cunoştinţelor actuale despre stabilitatea, circuitul şi variaţiile unei substanţe date (tabela 4).

Prelevarea continuă necesită aparate special construite, conectate la tubul de cateterizare al venei; valorile obţinute prin acest tip de prelevare reprezintă valoarea integrată a tuturor concentraţiilor substanţei analizate pe intervalul prestabilit pentru scurgerea continuă a sîngelui [44—52]. Acest sistem de prelevare nu a intrat în practica curentă.

Medicul practician şi şeful de laborator sînt datori să respecte condiţiile de pregătire ale bolnavului, protocolul de prelevare, particularităţile de stabilitate cu temperatura şi de adsorbţie ale substanţei analizate, modul de exprimare a rezultatelor ca şi interpretarea lor (tabela 5).

TABELA 4

Modalităţi de studiu ale variaţiei substanţelor biologice active în clinica umană

A. *Obiectul investigaţiei*

1. Lichide { ser, plasmă; urină; salivă; LCR; lichid amniotic
2. Ţesuturi { glandulare; neglandulare

B. *Mod de prelevare*

1. Discontinuu : prelevare efectuată la intervale prestabilite
2. Continuu : prelevare întreruptă la intervale prestabilite

C. *Condiţii statice şi dinamice naturale*

1. Condiţii bazale : pe nemîncate
   10—12 ore repaus fizic şi emoţional
2. Intervale în cadrul unor ritmuri biologice { circadian; menstrual; somn — veghe — etc.
3. Intervale după ingestia alimentară uzuală

D. *Condiţii dinamice provocate*

Probe de { stimulare sau inhibiţie

prin { factori naturali { alimente; foame; efort etc.
prin { factori artificiali { hormoni; medicamente; intervenţii chirurgicale

E. *Studii individuale (clinice) şi populaţionale*

Combinaţii ale parametrilor :
- sex
- vîrstă
- zonă geografică
- condiţii sociale şi economice
- ecologie specifică { muncă; mediul familial etc.
- genetică
- patologie

TABELA 5

Protocol de prelevare a probelor de sînge şi de urină

1. *Pregătirea bolnavului*
   - — întreruperea medicaţiei
   - — alimentaţia
   - — efortul
   - — emoţiile
   - — instruirea asupra colectării urinii.

2. *Proba dinamică*
   - Prelevarea probei zero
   - Procedura de stimulare sau de inhibiţie
   - Recoltarea probelor post-stimulare sau inhibiţie.

3. *Rezultat*:
   - Concentraţia în termeni de: { masă / molară, / unităţi biologice
   - Valori maxime şi minime
   - Aria de sub curba de stimulare
   - Raportare la { kg corp / m^2 s / 24 ore

4. *Interpretare*
   - Valori la normal
   - Care valori reflectă modificări patologice?

D. EXPRIMAREA REZULTATELOR ÎN SISTEMUL DE UNITĂŢI INTERNAŢIONALE SI

Rezultatele obţinute prin metodele RASC au fost exprimate fie în unităţi biologice (insulina, gonadotrofinele) în unităţi de masă (hormonul de creştere, prolactina, testosterona) raportate la mililitru sau la 100 ml pentru ser şi LCR, la volumul pe 24 de ore pentru urină şi la miligram pentru ţesuturi.

În ultimii ani se încearcă unificarea modului de prezentare a rezultatelor [31, 40, 41]. Organizatorii sistemului englez de laboratoare supraregionale (SAS) au stabilit în 1975 [31] raportarea datelor în sistemul de unităţi internaţionale SI şi anume :

— pentru substanţele cu greutăţi moleculare cunoscute ca steroizii, prostaglandinele, nucleotidele clinice etc., rezultatele sînt raportate în termeni de număr de unităţi moleculare (molul şi submultiplii săi) la litru. De exemplu limitele normale de 10—25 μg/100 ml ale cortizolului plasmatic au devenit 280—700 n mol/l, ţinînd seama că *GM* este 362,5;

— pentru proteinele a căror compoziţie nu este suficient de bine cunoscută, rezultatele sînt exprimate în unităţi de masă la litru, de exemplu limitele normale ale ACTH prezentate ca 10—80 pg/ml, devin 10—80 ng/l;

— hormonii care nu sînt disponibili în formă pură ca HGH, LH, FSH, insulina, sînt raportaţi în unităţi biologice la litru, de exemplu, limitele normale ale HGH sînt de 0,05—20 μU/ml, devin 0,05—20 mU/l;

— pentru urină, rezultatele se exprimă la urina de 24 ore.

Scanned with OKEN Scanner

Există unele inconveniente ale acestei unificări. Dacă raportarea la litru a unui hormon are un sens pentru ser și plasmă, acest mod de exprimare devine un non-sens pentru LCR. Dacă raportăm rezultatele în LCR

TABELA 6

Determinări RIA ale substanțelor hormonale și nehormonale, intrate în practica medicală curentă.

Substanța	Disciplina medicală
Hormoni peptidici	
HGH	Endocrinologie Pediatrie Medicină internă — nutriție
ACTH	Endocrinologie Oncologie
LH FSH Prolactină	Endocrinologie Ginecologie-obstetrică
TSH T_3 T_4	Endocrinologie Medicină internă
Insulină	Endocrinologie Medicina internă — diabetologia Chirurgia generală (și producătorii de insulină de extracție)
Gastrină	Gastroenterologie
HPL HCG	Ginecologie-obstetrică
alfa-Fetoproteină (AFT)	Oncologie
Antigen carcinoembrionar (ACE)	
Antigen Australia	Virusologia producătorii de derivate de sînge
Angiotensina I, II	Medicină internă Cardiologie
Steroizi	
CSR : cortizol Aldosteronă	Endocrinologie Medicina internă Cardiologie
Ovarieni : estrogeni progesteronă	Endocrinologie Ginecologie — obstetrică Oncologie
Testiculari : testosteronă	Endocrinologie
Alte substanțe	
Digoxină Digitoxină	Medicină internă Cardiologie
Acid folic Factor intrinsec Eritropoietină Fibrinogen	Hematologie

la mililitru, atunci apar dificultăți și confuzii în calculul raportului ser/LCR.

Determinările RIA pentru majoritatea hormonilor polipeptidici și steroizi sînt astăzi larg solicitate în unitățile spitalicești (tabela 6).

BIBLIOGRAFIE

1. „Radioisotopes in Medicine: in vitro Studies", Proceedings of a Symposium held at the, Oak Ridge Associated Universities, Nov. 13—16, 1967, editat de R.L. Hayes, F.A. Goswitz și B.E.P. Murphy.
2. „Principles of Competitive Protein-Binding Assays", editat de W.D. Odell și W.H. Daughaday, J.B. Lippincott Co., Philadelphia a. Toronto, 1971, (Workshop on Competitive Protein Binding Assays 28—III — 2.IV.1971, Harbor General Hospital, Torrance, California).
3. II-e Convegno su Metodi Radioimmunologia in Endocrinologia, Milano, 19—21 maggio 1975.
4. „In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine", Proceedings of a Symposium, 8—12 Sept., 1969, Viena.
5. „Protein and Polypeptide Hormones", editat de H. Margoulies, Excerpta Medica Internat. Congress Series no. 161, Excerpta Medica Found., 1969.
6. 2nd Symposium: „Steroid Assay by Protein Binding", Geneva, 1970, Karolinska Symp. on Research Methods in Reproductive Endocrinology.
7. „IAEA Panel on Standardization of Radioimmunoassay Procedures", 3—7 July, 1972, Viena.
8. „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Proceedings of a IAEA Symp., 10—14 Sept. 1973, Istambul.
9. „Hypothalamic Hormones: chemistry, physiology, pharmacology and Clinical uses", Internat. Symp., Milano, Oct. 14—16, 1974.
10. „Steroid Immunoassay", Fifth Tenovus Workshop 1975, editat de E.H.D. Cameron, S.G. Hillier și K. Griffiths, Alpha Omega Publ., Ltd., Cardiff, Wales, U.K. 1975.
11. „Research on Steroids", Transactions of the Sixth Meeting of the Internat. Study Group for Steroid Hormones, editat de H. Brener, C. Conti, A. Hughes, P. Jungblut, A. Klopper și L. Lerner, North Holl., Publ., Co., Amsterdam, 1975.
12. „IAEA Research Co-ordination Meeting on in vitro Procedures and Techniques", 29 Nov. — 3 Dec., 1976, Londra.
13. „Fertility and Sterility", Proceedings of the VIIth World Congress, Oct. 17—25, 1971, Tokio, Japonia.
14. „The fourth International Congress of Endocrinology", Washington 18—24 iunie, 1972, Internat. Congr. Ser. no. 256, Amsterdam, 1972.
15. „The fifth International Congres of Endocrinology", Hamburg, 18—24 iulie, 1976, Abstracts of Short Communications and Poster Presentations.
16. P. Franchimont, „Le dosage des Hormones Hypophysaires Somatotropes et Gonadotropes et son Application en Clinique", Editions Arscia S.A., Bruxelles, 1966.
17. M. Aubert, „Critical study of the radioimmunological assay for the dosage of the polipeptide hormones in plasma", Edizioni Minerva Medica, Torino, 1971.
18. E. Gurpide, „Tracer Methods in Hormone Research, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1975.
19. P. von Vecsei, „Aldosteron — Radioimmunoassay", Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1975.
20. „Radioimmunoassay Methods", editat de K.E. Kirkham și W.M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971.
21. „Immunologic Methods in Steroid Determination", editat de F.G. Péron și B.V. Caldwell, Appleton-Century-Crofts, Meredith Corp., New York, 1970.
22. „Methods of Hormone Radioimmunoassay", editat de B.M. Jaffe și H.R. Behrman, Academic Press, New York, 1974.
23. J.P. Ranson, „Practical Competitive Binding Assay Methods", The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1976.
24. G.E. Abraham, Handbook of Radioimmunoassay", Marul Dekker, New York, 1977, 822 pag.
25. Ligia Simionescu, „Radioimunoanaliza și metodele înrudite", Edit. medicală, București, 1978.
26. „Handbook of Endocrine Procedures", Inter Science Institute, Los Angeles, California, 1973.
27. L. Raith, „Introduction to Radioimmunoassay Methods", Byk-Mallinckrodt Radiopharmaceutical Diagnostika, Kern and Birner, Frankfurt am Main, 1975.
28. P. Pfannenstiel, „Diagnosis of Thyroid Diseases", Byk-Mallinckrodt-Radiopharmaceutical Diagnostika, Kern and Birner, Frankfurt am Main, 1975.
29. C.R.W. Edwards, „The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis", The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1976.
30. D. Evered, P.A. Vice, F. Clark, „The Investigation of Thyroid Disease", The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1976.

Scanned with OKEN Scanner

31. J. Landon, „Supra Regional Assay Service", (SAS), 2.2.76 (1976).
32. J.P. Felber, in Clinical Biochemistry-Principles and Methods" editat de H. Ch. Curtius și M. Roth, Walter De Gruyter, Berlin, New York, 1974, p. 324 și 621.
33. „Methods in Investigative and Diagnosis Endocrinology", editat de S.A. Berson și R.S. Yalow, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1975.
34. J. Ingrand, M. Hégésippe, „Radioisotopes au Service du Diagnostic Médical", Masson and Cie Edit., Paris, 1975.
35. „Traité de Médecine Nucléaire", editat de G. Meyniel, J.A. Berger et al., Flammarion Méd. Sci., Paris, 1975.
36. „Nuclear Medicine in vitro", editat de B. Rothfeld, J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Toronto, 1975.
37. „Nuclear Medicine", editat de H.N. Wagner Jr., H.P. Publ. Co. Inc. Publishers, New York, 1975.
38. Ligia Simionescu, în „Elemente de medicină nucleară", volum colectiv editat de S. Cotul, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
39. „New Techniques in Tumor Localization and Radioimmunoassay", editat de M.N. Croll, L.W. Brady, T. Honda și R.J. Wallner, John Wiley and Sons, New York, 1975.
40. „Radioimmunoassay of Hormones for Clinical Trials of Fertility Regulating Agents in Developing Countries", Report of a WHO Meeting of Experts, Technical Report Series, 578, WHO, Geneva, 1975.
41. „WHO Expert Committee on Biological Standardization" Twentysixth Report, Technical Report Series, 565, WHO, Geneva, 1975.
42. Lab World, Clin. Lab. Reference, Sept. 1976.
43. „IAEA International Training Course on RIA and Related Procedures", Pisa, Italia, B—14 mai, 1971.
44. A. Kowarski, R.G. Thompson, C.J. Migeon, R.M. Blizzard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *32*, 356 (1971).
45. R.G. Thompson, A. Rodrigues, A. Kowarski, C.J. Migeon, R.M. Blizzard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *35*, 334 (1972).
46. R.G. Thompson, A. Rodrigues, A. Kowarski, R.M. Blizzard, *J. Clin. Invest.*, *51*, 3193 (1972).
47. L. De Lacerda, A. Kowarski, C.J. Migeon, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *36*, 227 (1973).
48. L. De Lacerda, A. Kowarski, C.J. Migeon, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *36*, 1043 (1973).
49. L. De Lacerda, A. Kowarski, A.J. Johanson, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *37*, 366 (1973).
50. L. Plotnick, R.G. Thompson, I.Z. Beitins, R.M. Blizzard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *38*, 436 (1974).
51. L. Plotnick, R.G. Thompson, A. Kowarski, L. De Lacerda, C.J. Migeon, R.M. Blizzard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **40**, 240.
52. A. Kowarski, L. De Lacerda, C.J. Migeon, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **40**, 250 (1975).

Scanned with OKEN Scanner

LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS APPLIED IN NUCLEAR MEDICINE

Abstract

There exists at present no book in the world's scientific literature comparable to the present one: it bridges the gap between monographs on radiopharmacy and nuclear medicine, and includes a substantial part on *in vitro* assays.

The first part, "Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals", is an introduction into radioactivity, followed by chapters on the preparation of radioisotopes and labelled compounds, on assay and quality control. The most important radionuclides and their labelled compounds are discussed in more detail, including informations from the author's own experience.

The second part, "Radiopharmaceuticals in Clinical Medicine", is based on a pharmacological viewpoint. It contains elements of biokinetics, localization mechanisms under normal or pathological conditions, posology, indications and contra-indications in clinical practice, based on the author's experience and practice.

The third part, "*In Vitro* Assay Methods with Labelled Compounds", is addressed to physicians, chemists, biochemists or biophysicists interested in radioimmunology; it presents the principles and applications of radioimmunoassay, competitive binding assay and radioreceptor assay, emphasizing both the methodology and the pathways for developing an *in vitro* assay method for a new antigen. The chapter on applications also contains dynamic investigations, some of which were developed by the author of this part, and the utilization of co-products of the radioimmunoassay method in physiology.

Each part contains several chapters and hundreds of literature references: six chapters each for parts 1 and 2, eleven chapters for part 3.

The book will interest research and clinical physicians, chemists, radiochemists, biochemists, pharmacists, radiopharmacists, and biophysicists. Though the book is addressed to the practising post-graduate level, introductory chapters or paragraphs are comprehensive enough for students to benefit from the book.

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: ing. HENRIETTA TURCU
Tehnoredactor: FELICIA BOLOCAN

Bun de tipar 12 XII 1979. Tiraj 1880 ex. Format 16/70 × 100. Coli de tipar 31.

C.Z. pentru biblioteci mari { 621.039.8: 61
615.849
616.073.75

C.Z. pentru biblioteci mici: 621.039.8: 61

C. 137 — I. P. Informația,
str. Brezoianu nr. 23—25,
București

Dr. med. G. GEORGESCU conduce Laboratorul de medicină nucleară al Institutului de medicină fizică din București. Este secretarul Secției române de medicină nucleară a Uniunii Societăților de Științe Medicale, fiind unul din inițiatorii medicinii nucleare în România. În calitate de cercetător în medicina nucleară și fiziologia clinică, a publicat multe articole privind radiofarmaceuticele osteotrope, tireotrope și renale. A predat cursuri de pregătire în medicina nucleară atît în țară, cît și peste hotare.

Dr. med. LIGIA SIMIONESCU conduce Laboratorul de imunologie și radioimunologie al Institutului de endocrinologie din București. A introdus primele radioimunodozări din țară și a inițiat din 1967 producția de truse imunologice. A definit un nou domeniu interdisciplinar, imunoendocrinologia (1971). Studiază mecanismele de control endocrinologic și imunitar, și semnificația prezenței hormonilor în fluidul cerebrospinal.

Lei 42

Scanned with OKEN Scanner